

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Antropologie a genetika člověka



Bc. Lucie Sládková

Frekvence a význam genetických změn v genomu leukemických buněk u dětí s T-ALL
Frequency and significance of genetic changes in the genome of leukemia cells in children
with T-ALL

Diplomová práce

Školitelka: doc. RNDr. Zuzana Zemanová, CSc.

Odborná konzultantka: RNDr. Libuše Lizcová, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne _____

Bc. Lucie Sládková

Poděkování:

Ráda bych tímto poděkovala své školitelce doc. RNDr. Zuzaně Zemanové, CSc. za odborné vedení, pomoc a rady při zpracovávání této práce. Dále své odborné konzultantce RNDr. Libuši Lizcové, Ph.D. za věcné připomínky, cenné rady a vstřícnost při konzultacích. Mé poděkování patří také všem zaměstnancům Centra nádorové cytogenetiky ÚLBLD, VFN a 1. LF za ochotu a pomoc při vypracování praktické části diplomové práce. Děkuji své rodině a příteli za podporu v průběhu mého studia.

Abstrakt

T-ALL (T-buněčné akutní lymfoblastické leukemie) představují 10–15 % dětských akutních lymfoblastických leukemií a jedná se o klinicky i geneticky heterogenní onemocnění. Zhruba 50 % nemocných má normální karyotyp, a přestože byla popsána řada kryptických rekurentních chromosomových aberací, jejich prognostický význam není zcela jasný. Cílem studie bylo detailně analyzovat buňky kostní dřeně dětí s T-ALL pomocí cytogenomických metod, určit frekvenci kryptických aberací a posoudit jejich význam pro prognózu onemocnění. Vyšetřili jsme diagnostické vzorky u 67 dětí s T-ALL (19 dívek a 48 chlapců, medián věku 8 let). Získané změny jsme analyzovali metodami G-pruhování, I-FISH (Dako, Abbott) a MLPA (MRC-Holland). Chromosomové aberace jsme detekovali u 60 dětí (91 %). Nejčastějšími změnami byly delece genu *CDKN2A* (48×), které jsme pozorovali obvykle v kombinaci s dalšími změnami. Dále přestavby lokusů pro *TCR* geny (20×). Přestavby genu *TLX3* jsme detekovali v 18 případech a nikdy nebyly asociovány s přestavbami *TCR* lokusů. Komplexní karyotyp jsme prokázali u 10 nemocných s rekurentními zlomovými místy 5q35 a 10q24. 47 pacientů žije v první nebo druhé kompletní remisi, relaps onemocnění se vyskytl u 14 dětí a 20 jich zemřelo. Statistická analýza OS i EFS se významně lišila pouze pro parametr *TRA/TRD* ($p = 0,05$), který je spojován s dobrou prognózou. U parametru *TLX3* ($p = 0,05$) se statisticky významně lišilo jen OS a je asociován se špatnou prognózou. V našem souboru jsme prokázali kryptické chromosomové aberace u většiny nemocných. Vhodná kombinace cytogenomických metod umožňuje detekci specifických prognosticky významných aberací a přispívá k lepšímu pochopení jejich úlohy v patogenezi T-ALL.

Abstract

T-ALL (T-cell acute lymphoblastic leukemia) is identified in 10-15 % cases of pediatric acute lymphoblastic leukemia and it is a clinically and genetically heterogeneous disease. About 50 % of patients have normal karyotype and although a number of cryptic recurrent chromosome aberrations have been reported their prognostic significance is not entirely clear. The aim of the study was to analyze bone marrow cells of children with T-ALL using cytogenomic methods to determine the frequency of cryptic aberrations and to assess their importance for disease prognosis. We examined diagnostic samples of 67 children with T-ALL (19 girls and 48 boys, median age 8 years). We analyzed the changes by G-banding, I-FISH (Dako, Abbott) and MLPA (MRC-Holland) methods. We detected cryptic aberrations in 60 children (91 %). The most frequent changes were deletions of the *CDKN2A* gene (48×) which were usually observed in combination with other changes and aberrations of loci for *TCR* genes (20×). *TLX3* gene rearrangements were detected in 18 cases and were never associated with rearrangements of *TCR* loci. Complex karyotype was detected in 10 patients with recurrent breakpoints 5q35 and 10q24. 45 patients live in the first or second complete remission, relapse occurred in 14 children and 20 died. Statistical analysis of OS and EFS differed significantly only for the *TRA/TRD* parameter ($p = 0.05$) which is associated with good prognosis. For the *TLX3* parameter ($p = 0.05$), which is associated with poor prognosis, only OS differed significantly. In our study, we demonstrated cryptic chromosome aberrations in most patients. A suitable combination of cytogenomic methods allows the detection of specific prognostically significant aberrations and contributes to a better understanding of their role in the pathogenesis of T-ALL.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<i>ABL1</i>	ABL Proto-Oncogen 1	ABL proto-onkogen 1
ALL	Acute lymphoblastic leukemia	Akutní lymfoblastická leukemie
AML	Acute myeloid leukemia	Akutní myeloidní leukemie
Array CGH	Array comparative genomic hybridization	Komparativní genomová hybridizace na čípech
<i>ARID5B</i>	AT-rich interaction domain 5B	Gen kódující AT-bohatou interaktivní doménu 5B
B-ALL	B-cell acute lymphoblastic leukemia	B-buněčná akutní lymfoblastická leukemie
<i>BCL11B</i>	BAF chromatin remodeling complex subunit BCL11B	Gen kódující BAF chromatin komplex remodelující podjednotku BCL11B
<i>BCR</i>	BCR activator of RhoGEF and GTPase	Gen kódující BCR aktivátor RhoGEF a GTPázy
<i>BTG1</i>	BTG anti-proliferation factor 1	Gen kódující BTG anti-proliferační faktor 1
<i>CASP8AP2</i>	Caspase 8 associated protein 2	Gen kódující kaspázový protein 2
CCD	Charge-Coupled Device	Zařízení s vázanými náboji
<i>CDKN1A/2A/2B</i>	Cyclin dependent kinase inhibitor 1A/2A/2B	Gen kódující inhibitor cyklin dependentní kinázy 1A/2A/2B
<i>COL11A1</i>	Collagen type XI alpha 1 chain	Gen kódující řetězec kolagenu typu XI alfa
CpG	Cytosin-phosphate-Guanin	Cytosin-fosfát-Guanin
CML	Chronic myeloid leukemia	Chronická myeloidní leukemie
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride	4',6-Diamidino-2-fenylindol, Dihydrochlorid
DM	Double minutes	Mikroskopicky detekovatelné malé částice bez centromery (obsahují amplifikované onkogeny)
DNA	Deoxyribonucleotid acid	Deoxyribonukleová kyselina
<i>DNM2</i>	Dynamin 2	Gen kódující dynamin 2
DNTM1/3a/3b	DNA methyl-transferase 1/3a/3b	DNA methyl-transferáza 1/3a/3b
E2F	Factor E2	Faktor E2

<i>EBF1</i>	EBF transkription factor 1	Gen kódující EBF transkripční faktor 1
EFS	Event-free survival	Přežití do události
<i>EPHA7</i>	EPH receptor A7	Gen kódující EPH receptor A7
<i>ETV6</i>	ETS variant gene 6	ETS variantní gen 6
FISH	Fluorescence <i>in situ</i> hybridization	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
<i>GATA3</i>	GATA binding protein 3	Gen kódující GATA vazebný protein 3
<i>GRIK2</i>	Glutamate ionotropic receptor kainate type subunit 2	Gen kódující podjednotku 2 ionotropního glutamátového kainátového receptoru
GWAS	Genome Wide Association Studies	Celogenomová asociační studie
HDAC	Histon deacetylase	Histon deacetyláza
<i>HOXA9/10/11</i>	Homeobox A9/10/11	Gen kódující homeobox A9/10/11
<i>hMLH1</i>	Human mutL homolog 1	Gen kódující lidský mutL homolog 1
<i>hMSH2</i>	Human mutS homolog 2	Gen kódující lidský mutS homolog 2
HNPCC	Hereditary nonpolyposis colorectal cancer	Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom
<i>hPMS1</i>	Human PMS1 homolog 1, mismatch repair system component	Gen kódující lidský PMS1 homolog 1, součást mismatch repair systému
<i>hPMS2</i>	Human PMS1 homolog 2, mismatch repair system component	Gen kódující lidský PMS2 homolog 1, součást mismatch repair systému
HSR	Homogenously staining region	Homogenně se barvící oblast
I-FISH	Interphase fluorescence <i>in situ</i> hybridization	Interfázni fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
IgH	Immunoglobulin heavy chain	Těžký řetězec imunoglobulinu
<i>IKZF1</i>	IKAROS family zinc finger 1	Gen kódující zinkový prst 1 z genové rodiny IKAROS
<i>IL7R</i>	Interleukin 7 receptor	Gen kódující receptor interleukin 7
<i>LMO1/2</i>	LIM domain only 1/2	Gen kódující doménu LIM 1/2
ISCN	An International System for Human Cytogenomic Nomenclature	Závazná mezinárodní cytogenomická nomenklatura
<i>JAK1/2/3</i>	Janus kinase1/2/3	Gen kódující Janus kinázu 1/2/3
<i>LEF1</i>	Lymphoid enhancer binding factor 1	Gen kódující lymfoidní enhancer vazebný faktor 1
mBAND	Multicolor banding	Mnohobarevné pruhování
MBD	Methyl-CpG-binding domain	Methyl-CpG-vazebná doména
MDS	Myelodysplastic syndromes	Myelodysplastické syndromy

<i>MEF2C</i>	Myocyte enhancer factor 2C	Gen kódující myocytový enhancer faktor 2C
<i>MEOX2</i>	Mesenchyme homeobox 2	Gen kódující mesenchym homeobox 2
mFISH	Multicolor fluorescence <i>in situ</i> hybridization	Mnohobarevná fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
MMR	Mismatch repair system	Reparační systém
MLPA	Multiplex ligation-dependent probe amplification	Molekulárně cytogenemická metoda založená na navázání oligonukleotidových sond na komplementární cílovou sekvenci DNA, jejich následné ligaci a amplifikaci pomocí klasické PCR reakce
<i>MYB</i>	MYB proto-oncogene, transcription factor	Gen kódující MYB protoonkogen, transkripční faktor
<i>MYC</i>	MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor	Gen kódující MYC protoonkogen, bHLH transkripční faktor
<i>NOTCH1</i>	Notch receptor 1	Gen kódující receptor Notch 1
<i>NRAS</i>	NRAS proto-oncogene, GTPase	Gen kódující protoonkogen NRAS, GTPázu
<i>NUP214</i>	Nucleoporin 214	Gen kódující nukleoporin 214
OS	Overall survival	Celkové přežití
<i>PAX5</i>	Paired box 5	Gen kódující paired box 5
PCR	Polymerase chain reaction	Polymerázová řetězová reakce
PCR2	Polycomb repressive complex 2	Polykomb represivní komplex 2
<i>PHF6</i>	PHD finger protein 6	Gen kódující PHD prstový protein 6
<i>PIP4K2A</i>	Phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase type 2 alpha	Gen kódující fosfatidylinositol-5-fosfát 4-kinázu typu 2 alfa
PT	-	Pokojová teplota
<i>PTEN</i>	Phosphatase and tensin homolog	Gen kódující homolog fosfatázy a tensinu
<i>PTPN2</i>	Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 2	Gen kódující tyrozin-fosfatázový non-receptor typu 2
RAG protein	Recombination-activating protein	Protein aktivující rekombinaci
<i>RB1</i>	RB transcriptional corepressor 1	Gen kódující RB transkripční korepresor 1
RNA	Ribonucleotid acid	Ribonukleotidová kyselina

<i>RUNX1</i>	RUNX family transcription factor 1	Gen kódující transkripční faktor 1 z genové rodiny RUNX
sAML	Secondary acute myeloid leukemia	Sekundární akutní myeloidní leukemie
sMDS	Secondary myelodysplastic syndrome	Sekundární myelodysplastické syndromy
<i>SNHG5</i>	Small nucleolar RNA host gene 5	Malý jadéřkový RNA gen 5
SNP-array	Single Nucleotide Polymorphism Arrays	Jednonukleotidové polymorfismy na čípech
<i>SOSTDC2</i>	Sclerostin domain-containing 2	Gen kódující doménu pro sklerostin
<i>STIL</i>	<i>STIL</i> centriolar assembly protein	Gen kódující <i>STIL</i> protein sestavující centriolu
<i>SYNCRIP</i>	Synaptotagmin binding cytoplasmic RNA interacting protein	Gen kódující Synaptotagmin vazebný cytoplasmatický RNA interaktivní protein
T-ALL	T-cell acute lymphoblastic leukemia	T-buněčná akutní lymfoblastická leukemie
<i>TAL1</i>	<i>TAL</i> bHLH transcription factor 1	Gen kódující transkripční faktor <i>TAL1</i>
TCR	T-cell receptor	T-buněčný receptor
TGF-β	Transforming growth factor beta	Transformující růstový faktor beta
<i>TLX1</i>	T-cell leukemia homeobox 1	Gen kódující T-buněčný leukemický homeobox 1
<i>TLX3</i>	T-cell leukemia homeobox 3	Gen kódující T-buněčný leukemický homeobox 3
<i>TP53</i>	Tumor protein 53	Gen kódující tumor protein 53
<i>TRA</i>	T-cell receptor alpha locus	Lokus kódující T-buněčný alfa receptor
<i>TRB</i>	T-cell receptor beta locus	Lokus kódující T-buněčný beta receptor
<i>TRD</i>	T-cell receptor delta locus	Lokus kódující T-buněčný delta receptor
<i>TRG</i>	T-cell receptor gamma locus	Lokus kódující T-buněčný gamma receptor
TSG	Tumor-suppressor genes	Tumor-supresorové geny
UPD	Uniparental disomy	Uniparentální disomie
<i>WT1</i>	WT1 transcription factor	Gen kódující transkripční faktor WT1

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ

?	Nejasnost při identifikaci celého chromosomu nebo jeho části
+	Nadpočetná kopie chromosomu
-	Ztráta chromosomu
~	Rozsah v počtu chromosomů
add	Přidaný materiál neznámého původu
del	Delece
der	Derivovaný chromosom
dup	Duplikace
i	Isochromosom
idem	Část karyotypu subklonu shodná s výchozí linií
ins	Inzerce
inv	Inverze
mar	Marker chromosom
p	Krátká ramena
pter	Terminální část krátkých ramen
q	Dlouhá ramena
t	Translokace

OBSAH

1	Úvod.....	1
2	Literární přehled	2
2.1	Chromosomové aberace v nádorových buňkách.....	2
2.1.1	Numerické aberace	2
2.1.2	Strukturní aberace	3
2.2	Vznik nádorové buňky	4
2.2.1	Tumor-supresorové geny	4
2.2.2	Protoonkogeny	5
2.2.3	Mutátorové geny	6
2.2.4	Epigenetické změny	7
2.3	T-ALL	9
2.3.1	Chromosomové aberace u T-ALL	11
2.3.1.1	Abnormality chromosomu 9	12
2.3.1.2	Aberace zahrnující TCR geny	14
2.3.1.3	Translokace genů TLX1 a TLX3	15
2.3.1.4	Další genetické změny.....	16
2.4	Metody detekce chromosomových aberací.....	19
2.4.1	Klasická cytogenetická analýza	19
2.4.2	FISH.....	20
2.4.3	mFISH.....	22
2.4.4	mBAND	23
2.4.5	Array CGH.....	24
2.4.6	MLPA	24
3	Cíl práce.....	27
4	Materiál.....	28

4.1	Vyšetřený soubor nemocných	28
4.2	Chemikálie a roztoky pro klasickou cytogenetickou analýzu	28
4.3	Chemikálie a roztoky pro FISH.....	29
4.4	Chemikálie a roztoky pro izolaci DNA.....	30
4.5	Chemikálie a roztoky pro MLPA	30
5	Metody	31
5.1	Klasická cytogenetická analýza.....	31
5.1.1	Kultivace buněk kostní dřeně.....	31
5.1.2	Příprava preparátu	32
5.1.3	Barvení preparátů.....	32
5.1.4	Analýza karyotypu	32
5.2	FISH	33
5.2.1	Denaturace a hybridizace	33
5.2.2	Mikroskopická analýza	34
5.3	Izolace DNA.....	34
5.3.1	Postup práce	34
5.4	MLPA.....	35
5.4.1	Denaturace	35
5.4.2	Hybridizace	35
5.4.3	Ligace.....	35
5.4.4	PCR.....	36
5.4.5	Fragmentační analýza (ABI 3500 Prism).....	36
5.4.6	Analýza výsledků.....	36
5.5	Statistická analýza	36
6	Výsledky	37
6.1	Výsledky klasické cytogenetické analýzy.....	37
6.1.1	Aberace zahrnující <i>TCR</i> geny	37

6.1.2	Aberace chromosomu 9	38
6.1.3	Delece dlouhých ramen chromosomu 6.....	39
6.1.4	Komplexní přestavby	40
6.1.5	Numerické aberace	41
6.1.6	Další změny	42
6.2	Výsledky I-FISH	42
6.2.1	Gen <i>CDKN2A</i>	42
6.2.2	Geny <i>TCR</i>	42
6.2.3	Geny <i>TLX1</i> a <i>TLX3</i>	43
6.2.4	Geny <i>ABL1</i> a <i>BCR</i>	44
6.3	Výsledky MLPA	46
6.3.1	Delece genů <i>CDKN2A</i> a <i>CDKN2B</i>	46
6.3.2	Aberace genu <i>JAK2</i>	47
6.3.3	Aberace genu <i>PAX5</i>	47
6.3.4	Aberace genu <i>ETV6</i>	47
6.3.5	Aberace genu <i>BTG1</i>	47
6.3.6	Aberace genu <i>RBI</i>	48
6.3.7	Aberace genu <i>IKZF1</i>	48
6.3.8	Aberace genu <i>EBF1</i>	48
6.4	Kombinace chromosomových aberací	49
6.5	Současný klinický stav pacientů	50
6.6	Analýza přežití (EFS a OS).....	51
7	Diskuze	56
8	Závěr	64
9	Použitá literatura	65
10	Přílohy: tabulky.....	80

1 ÚVOD

ALL (akutní lymfoblastická leukemie) je heterogenní onemocnění krvetvorby. Tvoří 25 % všech dětských nádorů a je to nejčastější maligní onemocnění v dětském věku (Ward et al., 2014). Nejčastějším subtypem je B-ALL (B-buněčná akutní lymfoblastická leukemie), která představuje 85 % všech dětských ALL. Během uplynulých 50 let došlo k výrazným pokrokům v porozumění genetického původu této nemoci, což vedlo ke zvýšení šance na vyléčení z 10 % na 90 % (Hunger et al., 2012; Pui and Evans, 2013). Druhým subtypem je T-ALL (T-buněčná akutní lymfoblastická leukemie), která se vyskytuje v 10–15 % případů. Prognóza těchto dětí je špatná a zůstává velmi špatná i po transplantaci kostní dřeně (Nguyen et al., 2008; Hunger et al., 2012).

Analýza genomu nádorových buněk cytogenetickými a molekulárně-cytogenetickými metodami v době stanovení diagnózy a v průběhu onemocnění je nedílnou součástí vyšetření nemocných s nádorovým onemocněním. V současné době je z konvenčních pruhovacích metod nejčastěji rutinně využívané G-pruhování, které umožňuje identifikaci jednotlivých chromosomů podle závazné mezinárodní cytogenomické ISCN nomenklatury (ISCN, 2016). Mezi molekulárně-cytogenetické metody se řadí FISH, z ní odvozené metody mFISH a mBAND, dále analýza genomu na mikročipech a MLPA. Každá z těchto metod nám poskytuje unikátní informace o jednotlivých chromosomových aberacích a doplňují tak výsledky klasické cytogenetické analýzy.

Klasickou cytogenetickou analýzou jsme schopni nalézt chromosomové aberace u zhruba 50 % nemocných s T-ALL. Molekulárně cytogenomické metody umožňují detekovat i kryptické chromosomové aberace, které jsou pro toto onemocnění typické a významně tak zvyšují záchyt cytogenetických aberací. Častějším nálezem jsou strukturní odchylky, konkrétně přestavby zahrnující lokusy *TCR*, gen *TLX3* a delece krátkých ramen chromosomu 9, která zahrnuje geny *CDKN2A* a *CDKN2B* (Van Vlierberghe and Ferrando, 2012; Girardi et al., 2017; Karrman and Johansson, 2017).

Prognostický význam kryptických rekurentních chromosomových aberací však zatím není přesně znám. Studium těchto abnormalit získáváme cenné informace pro stanovení diagnózy a prognózy pacientů, můžeme posuzovat účinnost léčebných strategií a kontrolovat stav po ukončení léčby, tj. zda je pacient v remisi nebo došlo k relapsu.

Vlastní podíl na provedené práci představuje analýzu metodou I-FISH u pacientů diagnostikovaných v roce 2017 včetně popisu jednotlivých nálezů, analýza metodou MLPA u všech vyšetřených pacientů včetně vyhodnocení výsledků a kompletace všech výsledků klasické cytogenetické analýzy a molekulárně-cytogenomických metod.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 CHROMOSOMOVÉ ABERACE V NÁDOROVÝCH BUŇKÁCH

Chromosomové aberace lze definovat jako mutace na chromosomové úrovni a jedná se o charakteristický znak nádorových buněk. Tyto odchylky se řadí mezi změny získané a musíme je tak odlišovat od změn konstitučních, které jsou vrozené a přítomné zpravidla ve všech buňkách těla. Většina chromosomových aberací, které nacházíme u hematologických malignit a solidních nádorů, má klonální charakter (Stratton et al., 2009). Podle mezinárodně uznávané definice dle ISCN (ISCN, 2016) se za klon považuje nález dvou mitóz se stejnou odchylkou ve smyslu chromosomové přestavby (translokace, delece, inverze apod.) nebo stejným nadpočetným chromosomem, nebo tří mitóz, ve kterých stejný chromosom chybí.

U řady nádorových onemocnění jsou dnes známy nenáhodné chromosomové aberace, které jsou specifické pro konkrétní typ onemocnění a hrají tak důležitou roli při stanovení diagnózy. U většiny z nich je znám i jejich prognostický význam a umožňují tak zařadit nemocné do jednotlivých prognostických skupin s konkrétními léčebnými postupy (Lustosa de Sousa et al., 2015).

Změny chromosomů můžeme dělit podle toho, zda při nich dochází ke strukturním přestavbám nebo ke ztrátě či zisku celých chromosomů, na numerické a strukturní.

2.1.1 Numerické aberace

Numerické chromosomové aberace jsou změny týkající se počtu chromosomů v buňce, přičemž jejich struktura zůstává neporušená. Normální lidský karyotyp sestává ze 46 chromosomů, konkrétně z 22 párů autosomů a 1 páru gonosomů. Numerické aberace dělíme na polyploidie a aneuploidie podle toho, zda je postižen jeden chromosomový pár nebo celá sada chromosomů.

U polyploidii dochází ke znásobení celé haploidní sady chromosomů. Jedná se např. o triploidii, tetraploidii atd. U člověka jsou tyto změny v germinální linii letální a

mohou se vyskytovat pouze ojediněle ve tkáních s vysokou proliferační aktivitou. Nicméně v nádorových buňkách je jejich výskyt relativně častý.

Aneuploidie označuje stav, kdy se změní počet chromosomů v jednom páru. Může dojít ke ztrátě jednotlivých chromosomů (monosomie) nebo naopak k jejich zisku (trisomie, tetrasomie atd.). Taková buňka je pak buď hyperdiploidní (více jak 46 chromosomů) nebo hypodiploidní (méně než 46 chromosomů). Tyto změny vznikají nejčastěji v důsledku chybného rozchodu chromosomů během jaderného dělení (mitotická nondisjunkce) (Dürrbaum and Storchová, 2016).

2.1.2 Strukturní aberace

Strukturní chromosomové aberace vznikají jako následek chromosomových zlomů. V nádorových buňkách se vyskytuje celá řada strukturních aberací, ale relativně malé množství lze považovat za rekurentní změny, které mají vliv na rozvoj maligního onemocnění. Dělí se na balancované a nebalancované podle toho, zda dochází ke změně množství genetického materiálu. U balancovaných abnormalit, kam se řadí např. reciproké translokace a inverze, se množství genetického materiálu nemění. Naopak u nebalancovaných změn dochází k zisku či ztrátě genetického materiálu a jedná se např. o delece, amplifikace, isochromosomy a nereciproké translokace.

Delece představují jednu z významných nebalancovaných chromosomových abnormalit a postihují zejména tumor-supresorové geny (TSG), které mají za úkol kontrolu buněčného dělení (Orlow et al., 1995; Li et al., 1997). Naopak při zmnožení genetického materiálu dochází k amplifikaci některých protoonkogenů, a to v důsledku zmnožení jednotlivých genů nebo celých částí chromosomu. Amplifikace dělíme na episomální (tj. mimo chromosomy), které se obvykle projevují přítomností malých extrachromosomových fragmentů – episomů, které se označují jako DM (double minutes), a dále na intrachromosomové, kdy vznikají až desítky kopií daného genu na příslušném chromosomu. Pokud je amplifikovaný úsek tandemově integrovaný do chromosomu, vzniká tzv. HSR (homogenně se barvící oblast = homogenously staining region), který se při analýze jeví jako homogenně se barvící úsek na jinak normálním chromosomu (Hagemeijer and Graux, 2010).

Nejčastějšími balancovanými aberacemi jsou reciproké translokace, které mohou způsobovat nádorovou transformaci buňky dvěma základními mechanismy – buď přesunem protoonkogenu pod vliv silnějšího promotoru, tzv. pozičním efektem, nebo vznikem fúzního genu, který kóduje nový chimérický protein (Mitelman et al., 2007).

2.2 VZNIK NÁDOROVÉ BUŇKY

Nádorová buňka vzniká mutacemi ve specifických genech, které jim poskytují selektivní výhodu. Díky identifikaci těchto mutací získáváme klíčové informace o vzniku a progresi nádorového onemocnění a můžeme tak lépe určit správnou léčebnou strategii. Karcinogeneze je vícestupňový proces, během kterého dochází k mutacím ve dvou zásadních skupinách genů. Konkrétně se jedná o aktivační mutace protoonkogenů a deaktivující mutace tumor-supresorových genů (TSG) (Morris and Chan, 2015).

Kromě protoonkogenů a tumor-supresorových genů existuje ještě další skupina genů ovlivňující nádorovou transformaci. Jedná se o tzv. mutátorové geny, jež regulují syntézu DNA, zprostředkovávají opravy DNA a kódují další „housekeeping“ geny. Mutace v těchto oblastech zvyšuje pravděpodobnost vzniku dalších abnormalit v růstových regulačních faktorech, což dále přispívá k rozvoji nádorového onemocnění (Nowell, 1997).

Za vznikem nádorů stojí kromě genetických změn i epigenetické modifikace, což jsou dědičné změny genové exprese, ke kterým dochází beze změny primární genetické informace. Jedním z mechanismů ovlivňující nádorové geny je epigenetické umlčení (silencing), ke kterému dochází dvěma hlavními způsoby – metylací a přestavbou chromatinu (Grønbaek et al., 2007).

2.2.1 Tumor-supresorové geny

Tumor-supresorové geny (TSG) hrají důležitou roli při regulaci buněčného dělení. Jejich produkty potlačují buněčnou proliferaci a podporují buněčnou diferenciaci a apoptózu. Mutace či delece v těchto genech vedou ke ztrátě jejich funkce a tím i k malignímu zvratu buňky (Morris and Chan, 2015). Jako první předpověděl existenci TSG Knudson v roce 1971 na základě vývoje sporadických a dědičných retinoblastomů. Navrhl dnes známý Knudsonův model dvou zásahů, který popisuje, že mutace v TSG vede k projevu ve fenotypu pouze pokud dojde ke ztrátě nebo inaktivaci obou alel. V průběhu života jedince mohou nastat dvě somatické mutace nebo je jedna mutovaná alela vrozená a k druhé mutaci dojde během ontogeneze (Knudson, 1971).

Mezi nejvýznamnější tumor-supresorové geny patří *TP53* (dříve známý jako *p53*) a *RBI*. Produkt genu *TP53* (17p13) je protein p53, který je aktivován při poškození DNA v buňce. Aktivní p53 působí v jádře na gen *CDKN1A* (dříve známý jako *p21*), jehož produkty pozastaví buňku v G1 fázi a tím poskytnou čas na potřebné opravy. Pokud v buňce setrvává poškozená DNA, je navozena apoptóza. V buňkách s inaktivovaným *TP53* nedochází k zástavě v G1 fázi a buňka tudíž nezíská důležitý čas pro reparaci DNA.

Navíc je poškozena i schopnost vyvolat apoptózu, což u potencionálně maligních buněk umožňuje jejich delší přežívání a případně i dělení (Levine, 1997). Aberace (mutace, delece) genu *TP53* jsou nejčastější změnou asociovanou s lidskými nádory. Je popisována až u 70 % všech nádorových onemocnění (Březinová, 2000).

Gen *RBI* (13q14) a jeho mutace byly zkoumány při studiu retinoblastomů. Produkt tohoto genu, Rb protein, působí v jádře buňky, kde váže transkripční faktory E2F během G1 fáze, čímž pozastavuje buněčné dělení. K množení buněk dávají signál cyklin-dependentní kinázy, které v příznivých podmínkách fosforylují Rb protein a tím uvolní navázané transkripční faktory, aby mohlo dojít k transkripci replikačních proteinů. Pokud nastane mutace v *RBI*, hladina volných transkripčních faktorů je stále vysoká, což umožňuje nepřetržitou buněčnou proliferaci (Ikeda et al., 1996). Inaktivace obou alel se kromě retinoblastomu vyskytuje např. u osteosarkomů (Chauveinc et al., 2001) a malobuněčných karcinomů plic (Kaye and Harbour, 2004).

2.2.2 Protoonkogeny

Protoonkogeny jsou buněčné geny, jejichž produkty se uplatňují během normálního růstu a vývoje buňky. Byly objeveny jako transdukované geny retrovirů a díky navazujícím studiím bylo zjištěno, že protoonkogeny mohou být aktivovány i během neoplastických procesů. Aktivní formou protoonkogenů jsou onkogeny, které mají dominantní charakter, tzn. k rozvoji nádorového onemocnění stačí mutace pouze jedné alely (Futreal et al., 2004). Výsledkem aberací zahrnující protoonkogeny je buď nadměrná exprese normálního produktu nebo normální/nadměrná exprese aberantního produktu. Jednotlivé protoonkogeny nejčastěji kódují růstové faktory, receptory růstových faktorů, jaderné regulační proteiny, regulační proteiny signálních drah a tyrozin-kinázy (Stowers et al., 1987).

Mechanismem aktivace může být vznik nádorově specifického fúzního genu. Charakteristickým příkladem je fúze genů *ABL1* (9q34) a *BCR* (22q11) v důsledku translokace t(9;22)(q34;q11), což vytváří chimérický gen *BCR/ABL1*. Ten pak kóduje fúzní protein s odlišnou tyrozin-kinázovou aktivitou, což přispívá k rozvoji maligních procesů (Lugo et al., 1990).

Druhá možnost aktivace protoonkogenů je jeho přesun do oblasti silnějšího promotoru. Tento typ přestavby je přítomný např. u Burkittova lymfomu, kdy dochází v rámci translokace t(8;14)(q24;q32) k přemístění onkogenu *MYC* z oblasti 8q24 do oblasti kódující IgH (14q11.2). Tato oblast je v dospělých B-buňkách vysoce aktivní, proto

dochází k nadměrné expresi onkogenu *MYC* (Hecht and Aster, 2000). Méně často se u tohoto onemocnění vyskytují translokace t(2;8)(p12;q24) a t(8;22)(q24;q11), při kterých je *MYC* přesouván do genů pro IgK (2p12) nebo IgL (22q11) (van den Berg and Stevens-Kroef, 2017). V důsledku translokace dochází k aktivaci protoonkogenů nejčastěji u leukemií, naopak u solidních nádorů jsou protoonkogeny častěji aktivovány amplifikací (Alitalo et al., 1983).

2.2.3 Mutátorové geny

Mutátorové geny jsou odpovědné za reparaci poškozené DNA a kontrolují stabilitu buněčného genomu. Pro nádorové onemocnění jsou nejdůležitější změny v MMR (mismatch repair systém). Jejich význam v „mutátorovém“ fenotypu nádoru byl objeven při studiu dědičných i sporadických solidních nádorů, které vykazovaly chybný počet genů pro opravy DNA, což se ukázalo jako důležitý prvek při rozvoji epiteliálních malignit (Modrich, 1994). Později bylo objeveno, že tyto geny hrají důležitou roli i u hemoblastóz, např. snížená exprese TGF- β u T-buněčného Sézaryho lymfomu (Capocasale et al., 1995).

MMR zprostředkovává opravy chyb DNA, které vznikly při replikaci. Pokud se vyskytne mutace v mutátorových genech, nedochází k opravám DNA, tudíž se jednotlivé abnormality v DNA kumulují a může se zvyšovat frekvence mutací v genomu, což vede k iniciaci maligní transformace. Změny v mutátorových genech jsou recesivního charakteru, musí tedy dojít k mutaci obou alel, aby se projevil nádorový fenotyp (Baretti and Le, 2018).

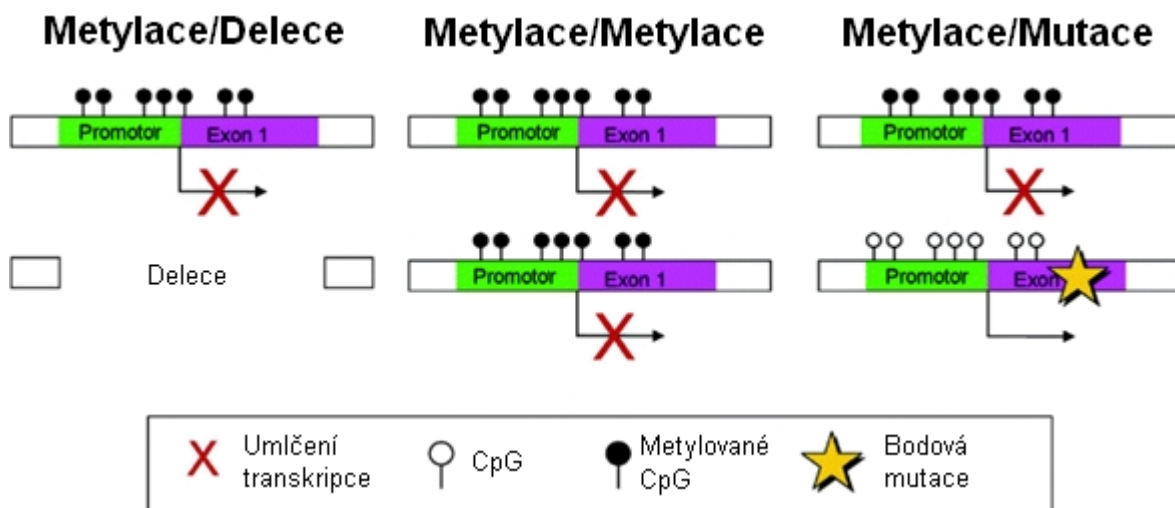
Mezi nejvýznamnější mutátorové geny řadíme *hMSH2*, *hMSH6*, *hMLH1*, *hPMS1*, *hPMS2* (Li, 2008). Defekty v MMR genech jsou typické například pro HNPCC (hereditární nepolypózní kolorektální karcinom) (Fishel et al., 1993). U tohoto onemocnění je přítomná specifická nestabilita mikrosatelitů, což je charakteristický důsledek poruchy MMR (Aaltonen et al., 1993, 1994). Nestabilní mikrosatelity a další krátké tandemové repete se postupně prodlužují, z čehož vyplývá, že chyby v MMR mohou způsobovat hromadění mutací v onkogenech či TSG a tím přispívají k rozvoji nádorového bujení (Aaltonen et al., 1993; Fishel et al., 1993). Kromě HNPCC se tento typ změny vyskytuje i u dalších nádorových onemocnění, např. u chronické myeloidní leukemie, chronické lymfoblastické leukemie a myelodysplastického syndromu (Robledo et al., 1995). Navíc je známo, že u pacientů s HNPCC se mohou rozvinout určité formy lymfoidní leukemie a lymfomů. Z toho lze usoudit, že mutace v MMR genech mohou ovlivnit hematopoetické buňky a přispět tím k rozvoji leukemií nebo lymfomů (Love, 1985).

2.2.4 Epigenetické změny

Analýza epigenetických změn v nádorových buňkách v posledních letech přispěla k lepšímu porozumění maligní patogeneze. V současné době je známo, že epigenetické umlčení genové exprese může být považováno za stejně významné pro rozvoj maligního onemocnění jako delece a jiné inaktivační mutace (Grønbæk et al., 2007).

Během replikace je metylační vzorec templátového vlákna DNA přenášen na nově vznikající vlákno. Tento proces řídí enzymy ze skupiny DNTM (DNA metyltransferázy), konkrétně DNTM1 (Bestor, 2000). U nádorových buněk může vlivem DNTM3a a DNTM3b docházet k tzv. *de novo* metylaci, která se objevuje na původně nemetylovaném vláknu (Okano et al., 1999). Pokud je takto metylován promotor, dochází k inhibici transkripce daného genu. Tento proces je významný zejména pro TSG. Aby došlo k rozvoji maligního onemocnění vlivem TSG, je třeba inaktivovat obě alely tohoto genu (Jones and Baylin, 2002; Herman and Baylin, 2003). K tomu může dojít jak z důvodu epigenetických změn, tak v důsledku kombinace genetických a epigenetických modifikací (Obrázek 1).

Metylace promotoru však není jediný epigenetický mechanismus, jak může docházet k umlčení genové transkripce. Důležitou roli v iniciaci transkripce hraje struktura chromatinu. Většina chromatinu na chromosomech je transkripčně neaktivní (heterochromatin) a vytváří konstantně spiralizované struktury. Existují ale i úseky, které jsou v interfázi rozvolněné a obsahují transkribované úseky (euchromatin). Metylované CpG ostrůvky na sebe vážou MBD (methyl-CpG-binding domain – vazebná doména pro metylované CpG ostrůvky), který přitahuje HDAC (histon deacetyláza), které odstraňují acetylové konce histonů (Jones et al., 1998; Jones and Baylin, 2002). V důsledku těchto změn může docházet k přestavbě chromatinu, která vede ke tvorbě kompaktnějších struktur z rozvolněnějších úseků, čímž se zamezí přístup transkripčního aparátu a daný usek je umlčen (Grønbæk et al., 2007).



Obrázek 1 Mechanismus bialelické inaktivace TSG. Pokud je jedna z alel metylována, druhá alela může být inaktivována delecí, metylací nebo bodovou mutací. Převzato dle Grønbaek et al. (2007).

2.3 T-ALL

Dětská T-buněčná akutní lymfoblastická leukemie se řadí mezi agresivní hematologické malignity. Představuje 10–15 % případů dětské ALL a je třikrát častější u chlapců než dívek. Jedná se o relativně vzácné onemocnění, touto chorobou onemocní v České republice přibližně 10 dětí ročně. Poprvé byla tato nemoc pozorována v roce 1844 lékařem Alfrédem Donné, který studoval krev pacientů se splenomegalií. Pozorováním v mikroskopu určil, že to, co se dříve označovalo jako hnis v krvi, je ve skutečnosti leukocytóza a správně odhadl, že její příčinou je zástava buněčného zrání (Degos, 2001; Karrman and Johansson, 2017).

T-ALL vzniká v brzlíku (*thymus*) z nezralého thymocyty jako důsledek nahromadění genetických a epigenetických změn. Brzlík je mediastinální orgán, který se nachází za hrudní kostí a jeho hlavní úlohou je diferenciaci lymfocytů ve funkční, imunokompetentní T-lymfocyty (Miller, 2011). Toto „dospívání“ závisí na vstupu progenitorových buněk (thymocytů) z kostní dřeně do brzlíku. Nezralé thymocyty nejprve prochází kůrou a pak putují do dřeně, přičemž probíhá jejich maturace, která spočívá sestavení T-buněčných receptorů (TCR). Výsledkem celého procesu musí být lymfocyty, jejichž TCR jsou schopné pozitivní i negativní selekce. Zralé T-lymfocyty poté opouští *thymus* a vstupují do krevního řečiště (Karrman and Johansson, 2017). Méně než 5% thymocytů dospěje ve zralé T-lymfocyty, přes 95 % progenitorových buněk není schopno tvořit efektivní součást imunitního systému (Egerton et al. 1990). Normální vývoj T-buněk je zprostředkováván transkripčními faktory, které mají společně s dalšími geny za úkol regulaci jednotlivých fází vývoje buňky. U T-ALL dochází k pozastavení vývoje ve stádiích, kdy je utlumena diferenciaci a apoptóza, ale nadále pokračuje buněčná proliferace (Yui and Rothenberg, 2014). Hlavními protoonkogeny, které zprostředkovávají tuto narušenou dráhu, jsou u T-ALL signální receptor NOTCH1 a transkripční faktory *TAL1*, *TLX1* a *TLX3* (Van Vlierberghe and Ferrando, 2012).

Etiologické studie se v minulosti zaměřovaly především na ALL z B-buněk. Kvůli relativně nízké incidenci T-ALL je těžké získat spolehlivá data pro tento subtyp, přesto můžeme do určité míry využívat informace získané při studiu etiologie B-ALL. Jediný vnější faktor, který prokazatelně způsobuje ALL, je ionizující záření (Wakeford, 2008). Prenatální a postnatální expozice je však nyní udržována na minimu, proto by vliv ionizujícího záření neměl být považován za významný vnější faktor pro rozvoj onemocnění. Ani u dalších rizikových faktorů, jako jsou kouření rodičů, chemikálie

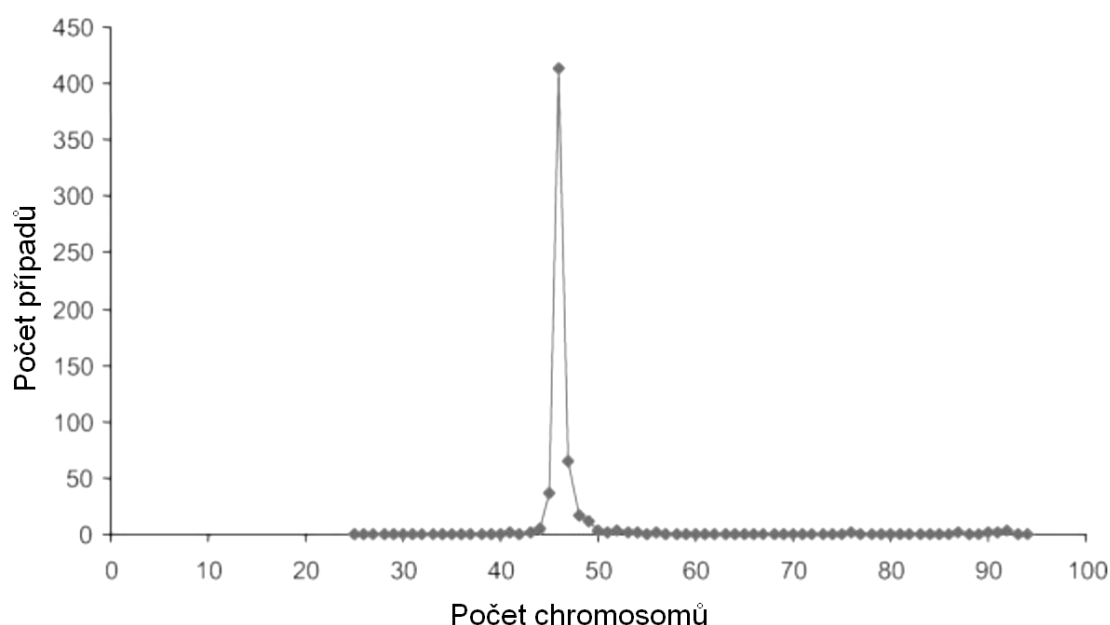
v domácnosti, pesticidy a dieta matky se vliv na incidenci dětské ALL neprokázal (Eden, 2010). Některé studie poskytují nepřímé důkazy pro teorii tzv. „pozdní infekce“ („delayed-infection“). Děti, které byly vystaveny běžným infekcím v nízkém věku, měly snížené riziko vzniku ALL. Tyto studie však byly zaměřeny hlavně na případy B-ALL (Urayama et al., 2010). V rozvoji ALL hrají roli epigenetické a genetické odchylky. Bylo prokázáno, že některé dědičné syndromy mohou přispět k vyššímu riziku rozvoje ALL. Důvodem jsou mutace vysoce penetrantních genů přítomné v germinální linii. I přesto se ale jedná pouze o vzácné případy (Seif, 2011). Pokud jsou vnější a/nebo genetické faktory významné pro etiologii ALL, dalo by se předpokládat, že sourozenci dětí s ALL budou mít zvýšené riziko rozvoje onemocnění. Obecně však tato hypotéza neplatí (Winther et al., 2001). Nicméně ve studii Schmiegelow et al. (2012) prokázali, že existují rodiny s vyšším rizikem rozvoje T-ALL. To naznačuje, že existují určité genetické faktory specifické pro T-ALL, které ale zatím nejsou známy (Schmiegelow et al., 2012). Během celogenomových studií (GWAS – genomic wide association studies) byly objeveny polymorfismy v několika genech, např. *ARID5B*, *CDKN2A*, *GATA3*, *IKZF1* a *PIP4K2A*, které mohou přispívat ke vzniku dětské ALL. Avšak většina změn v těchto genech je asociována s B-ALL, pouze u aberace genu *CDKN2A* byla prokázána spojitost s T-ALL (Papaemmanuil et al., 2009; Treviño et al., 2009; Sherborne et al., 2010; Perez-Andreu et al., 2013).

Díky moderním léčebným postupům se šance na přežití 5 let bez události u dětí s T-ALL postupně zvýšila na 70–80 %, což je však stále horší než u dětí s B-ALL (Roti and Stegmaier, 2014). Děti s touto diagnózou mají střední až vysoké riziko relapsu (Jeha and Pui, 2009) a spolu s primární rezistencí na léčbu je to hlavní důvod selhání terapie. Relaps onemocnění se většinou objevuje již během léčby nebo brzy po jejím ukončení. Prognóza pacientů s relapsem je špatná, pouze u zhruba 15–25 % pacientů dochází po druhé terapii k trvalé remisi (Einsiedel et al., 2005; Nguyen et al., 2008).

Na základě analýzy a porovnání genetických změn v době diagnózy a relapsu můžeme rozlišovat čtyři různé typy relapsů. U prvního typu jsou v diagnostické i relabované tkáni shodné aberace. U druhého typu jsou v obou vzorcích také stejné aberace, ale v relabovaném jsou přítomny i další nové změny (tzv. klonální evoluce). U třetího typu vzorky z diagnózy a relapsu sdílejí aberace důležité pro rozvoj onemocnění a navíc oba vzorky obsahují další náhodné aberace (tzv. evoluce z pre-leukemického klonu). Čtvrtý typ představují geneticky zcela odlišné leukemie (Mullighan et al., 2008; Clappier et al., 2011; Szczepański et al., 2011; Tzoneva et al., 2013; Karrman et al., 2015).

2.3.1 Chromosomové aberace u T-ALL

Klasickou cytogenetickou analýzou je podle literatury možné odhalit klonální odchylky u 50 % případů T-ALL. Frekvence záchytu je výrazně nižší než u dětské B-ALL, kde změny karyotypu nalézáme u 85–90 % případů (Graux et al., 2006; Zachariadis et al., 2011). Kolem 70 % abnormálních karyotypů u T-ALL má 46 chromosomů, tj. jsou pseudodiploidní (karyotyp v buňce se jeví jako diploidní, ale obsahuje strukturní chromosomové přestavby). U zbývajících případů se nejčastěji vyskytují karyotypy s 45 nebo 47–49 chromosomy (Graf 1). Některé rekurentní numerické aberace popsané ve spojitosti s B-ALL, jako např. vysoká hyperdiploidie, nízká hypodiploidie, triploidie nebo tetraploidie, u T-ALL nalézáme zřídka. Výjimkou jsou ojedinělé případy tetraploidie (Paulsson and Johansson, 2009; Lemež et al., 2010).



Graf 1. Modální počet chromosomů 637 dětí s T-ALL a abnormálním cytogenetickým nálezem. Převzato a upraveno dle Paulsson and Johansson (2009).

Asi v polovině případů s abnormálním karyotypem je přítomna jen jedna chromosomová změna. Případy se dvěma změnami lze nalézt u 25 % případů, se třemi změnami u 10 % a se čtyřmi změnami celkem u 8 % případů (Zhang et al., 2012). Strukturní aberace jsou mnohem častější než numerické, karyotypy s jednou aberací obsahují z 90 % strukturní změnu a pouze z 10 % se jedná o numerickou (Karrman and Johansson, 2017).

Klasickou cytogenetickou analýzou lze nejčastěji detekovat přestavby zahrnující lokusy *TCR*, ztráty na krátkých ramenech chromosomu 9, delece dlouhých ramen chromosomu 6, trisomii chromosomu 8, delece dlouhých ramen chromosomu 11 a ztrátu krátkých ramen chromosomu 12 (Schneider et al., 2000; Karrman et al., 2009; Karrman and Johansson, 2017).

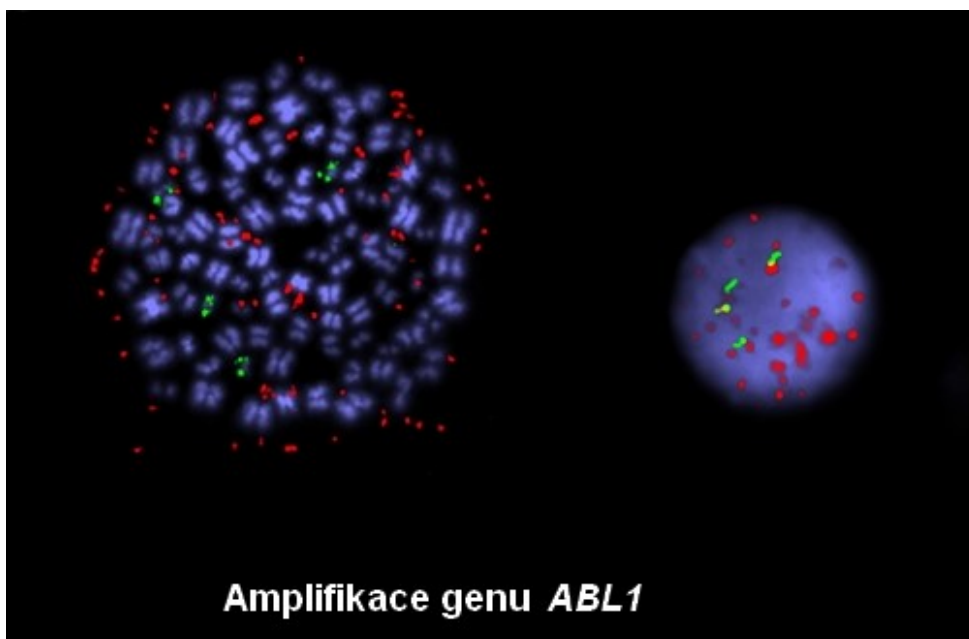
Důležitou roli v detekci chromosomových aberací hrají molekulárně cytogenetické metody, díky kterým jsme schopni detekovat i kryptické změny pod rezoluční schopností klasické cytogenetické analýzy. Tyto nejčastější a nejvýznamnější aberace jsou uvedeny v Tabulce 2. Až u 50–70 % nemocných jsou přítomny delece genů *CDKN2A* a *CDKN2B* (Ferrando et al., 2002; Hagemeijer and Graux, 2010; Girardi et al., 2017; Karrman and Johansson, 2017). U 30 % pacientů jsou translokace nebo inverze v lokusech *TCR* (Le Noir et al., 2012). Dále nacházíme přestavby genu *TLX3* ve 20–25 % případů (Bernard et al., 2001) a přestavby genu *TLX1* ve 4–8 % případů (Girardi et al., 2017; Gindina and Beel, 2018).

2.3.1.1 Abnormality chromosomu 9

Nejčastější chromosomovou aberací u T-ALL jsou delece krátkých ramen chromosomu 9, konkrétně oblasti 9p21, které se vyskytují až v 50–70 % případů. Nacházejí se zde tumor-supresorové geny *CDKN2A* a *CDKN2B*, které hrají důležitou roli v regulaci buněčného cyklu (Ferrando et al., 2002; Hagemeijer and Graux, 2010; Girardi et al., 2017; Karrman and Johansson, 2017). Gen *CDKN2A* kóduje inhibitor cyklin-dependentních kináz p16^{INK4A} a gen *CDKN2B* kóduje p15^{INK4B}, které negativně regulují přesun z G1 do S fáze buněčného cyklu (Kawamura et al., 1999). V alternativním čtecím rámci genu *CDKN2A* je kódován p14^{ARF}, který aktivuje tumor-supresor *TP53*. Vysoká frekvence delece těchto genů může být způsobena chybnou aktivitou RAG rekombináz (enzymy, které iniciují V(D)J rekombinaci během maturačních procesů T- a B-lymfocytů) (Cayuela et al., 1997; Kitagawa et al., 2002). Ty jsou aktivní v lymfoidní linii a jejich rozpoznávací sekvence leží v blízkosti zlomů *CDKN2A/CDKN2B* genů (Gebhart et al., 2002; Raschke et al., 2005).

Dalším významným genem na chromosomu 9 je *ABL1* v oblasti 9q34. Fúze tohoto genu se vyskytují v 8 % případů T-ALL, přičemž nejčastější fúzní gen je *NUP214-ABL1* v zhruba 5 % případů (Ballerini et al., 2005; Graux et al., 2009; Hagemeijer and Graux, 2010). Ten pravděpodobně vzniká vystřížením části genetického materiálu mezi intronem 1 genu *ABL1* a introny 23–34 genu *NUP214*. Tato vystřížená oblast může následně tvořit

cirkulární extrachromosomový episom (DM). Během buněčného dělení dochází k nerovnoměrné segregaci tohoto episomu a tím ke zvýšení jeho počtu v buňce (Obrázek 2) (Graux et al., 2009). Fúzní gen *NUP214-ABL1* se téměř výhradně vyskytuje současně s aberacemi *TLX1* nebo *TLX3* (Graux et al., 2009; Kleppe et al., 2010; Liu et al., 2017). Dalšími chimérickými geny jsou *ETV6-ABL1* a *BCR-ABL1*, které se však u T-ALL vyskytují extrémně vzácně. Pouze zřídka dochází k výskytu nadpočetné kopie genu *ABL1* v důsledku jiného mechanismu (Hagemeijer and Graux, 2010).



Obrázek 2. Amplifikace *ABL1* detekovaná metodou I-FISH (lokus-specifická sonda pro gen *BCR* značená zelenou barvou, lokus-specifická sonda pro gen *ABL1* značená červenou barvou). Převzato z databáze Centra nádorové cytogenetiky VFN a I.LF UK.

Odhadem u 50 % pacientů s T-ALL dochází k nadměrné aktivaci genu *NOTCH1* v oblasti 9q34.3 (Weng et al., 2004), jehož funkce je určování specializace vyvíjejících se buněk (tzv. cell fate determination). Také hraje roli v proliferaci a diferenciaci buněk a apoptóze. Jeho produkt má mnoho funkcí, proto je považován jak za onkogen, tak za TSG (National Library of Medicine, 2015). Aberantní signalizace *NOTCH1* u T-ALL byla původně spojována s translokací *t(7;9)(q34;q34.3)*, která vede k expresi jeho částečně aktivní formy (Ellisen et al., 1991). Později se ale ukázalo, že mutace *NOTCH1* zahrnují specifické domény, které jsou zodpovědné za kontrolu iniciace a terminace signalizace tohoto receptoru. Alternativním mechanismem abnormální aktivace *NOTCH1* signální kaskády je ztráta funkce jejich negativních regulátorů (Weng et al., 2004; Sulis et al., 2008). Zatím není známo, jakým mechanismem *NOTCH1* způsobuje T-ALL, ale předpokládá se, že se tak děje během interakce *NOTCH1* a *PCR2*, což je komplex, který ovlivňuje obnovu kmenových buněk (Ntziachristos et al., 2012).

2.3.1.2 Aberace zahrnující *TCR* geny

Translokace a inverze v genech *TCR* jsou považovány za hlavní znak T-ALL. Pomocí FISH nebo PCR analýzy je můžeme nalézt až u 30 % pacientů. Vzhledem ke kryptickému charakteru většiny z těchto změn nejsme schopni asi v polovině případů tyto změny identifikovat klasickou cytogenetickou analýzou (Le Noir et al., 2012).

Lidské *TCR* receptory (T-buněčné receptory) se skládají z *alfa* a *beta* řetězce, jejichž geny obsahují V, D a J segmenty, které se během diferenciaci buňky různě přeskupují. *TCR* geny podléhají této přestavbě ve specifickém pořadí, a to nejprve u oblasti *TRD* (14q11.2), poté *TRG* (7p14), následuje *TRB* (7q34) a poslední *TRA* (14q11.2). Lokus *TRD* se nachází uvnitř lokusu *TRA*, což znamená, že rekombinace v *TRA* vede k delecii v *TRD*. Každá T-buňka obsahuje originální kombinaci přestaveb *TCR* genů díky náhodnému spojování segmentů genů během V(D)J rekombinace. Tím pádem je zajištěna rozmanitost receptorů T-buněk, které jsou důležité při rozpoznávání různých typů antigenů (Nemazee, 2006).

V nádorových buňkách však dochází ještě k dalším somatickým aberacím v genech *TCR*. Dle literatury se nejčastěji vyskytují aberace v lokusech *TRB* a *TRA/TRD* a změny v *TRG* jsou velmi vzácné (Cauwelier et al., 2006; Le Noir et al., 2012; Sugimoto et al., 2014). Přestavby *TCR* vznikají během somatické rekombinace v thymocytech, kdy dochází působením RAG proteinů k rozsáhlým dvouvláknovým zlomům. Pokud se v blízkosti tohoto procesu vyskytnou další dvouřetězcové zlomy, DNA reparační systémy mohou chybně spárovat vlákna a dochází k nehomologní rekombinaci (Le Noir et al., 2012). Ta pravděpodobně neposkytuje buňce žádnou výhodu, tudíž ani nedochází k její detekci. Pokud ale dojde ke zlomu v blízkosti genů, které fungují jako enhancery nádorové transformace, mohou se dostat pod vliv aktivnějších *TCR* enhancerů/promotorů a tím se nadměrně zvýší jejich exprese (Graux et al., 2006).

Celkem je v současnosti známo zhruba 30 translokačních partnerů genů *TCR*. Jedná se zejména o geny regulující transkripční faktory pomocí interakcí protein-protein. Vzácně k nim můžeme řadit i geny kódující cykliny, kinázy a receptory. Výsledkem *TCR* translokací je ve všech případech změna regulace transkripce těchto translokačních partnerů s následnou zvýšenou genovou expresí. Podle partnerských genů, např. geny *TAL1*, *TLX1* a *TLX3*, můžeme definovat podskupiny T-ALL, pro které jsou charakteristické odlišné modely exprese (Ferrando et al., 2002; Van Vlierberghe et al., 2008b). Nejčastější partnerské geny jsou shrnuty v Tabulce 1.

Tabulka 1. Nejčastější translokační partneři genů *TCR*. Upraveno dle Girardi et al. (2017) a Karrman and Johansson (2017).

Gen	Lokalizace	Frekvence %
<i>LMO2</i>	11p13	3-12
<i>TLX1</i>	10q24.31	5-10
<i>TAL1</i>	1p33	3-6
<i>HOXA9/10/11</i>	7p15	5
<i>MYB</i>	6q23	3
<i>MYC</i>	8q24	1-3
<i>LMO1</i>	11p15	1-2
<i>TLX3</i>	5q35.1	<1
<i>NOTCH1</i>	9q34	<1

2.3.1.3 Translokace genů *TLX1* a *TLX3*

Gen *TLX1* (dříve znám jako *HOX11*) v oblasti 10q24.31 je ve zdravých buňkách důležitý pro správný vývoj sleziny. K jeho přestavbám dochází nejčastěji v translokaci s geny *TCR*, tj. t(10;14)(q24;q11) nebo t(7;10)(q35;q24), které se vyskytují u 4–8 % případů (Girardi et al., 2017; Gindina and Beel, 2018). V obou případech dochází k jeho nadměrné expresi způsobené přesunem pod vliv silnějšího promotoru v lokusu pro T-buněčné receptory (Ferrando et al., 2002).

Translokace t(10;14)(q24;q11) je reciproká translokace, během které dochází na chromosomu 10 ke zlomu v oblasti genu *TLX1*, který se dostává do juxtapozice (tj. postavení vedle sebe nebo blízko sebe) k lokusu *TRA/TRD* (Kagan et al., 1989). Tato aberace má za následek vyšší expresi *TLX1* genu, která se běžně ve zdravých T-buňkách nevyskytuje (Hecht et al., 1984), a proto se považuje za klíčový aspekt v iniciaci maligní transformace u T-ALL (Kagan et al., 1989). Během t(7;10)(q35;q24) dochází k translokaci genu *TLX1* do blízkosti lokusu *TRB*. Výsledkem je také nadměrná exprese tohoto genu (Kennedy et al., 1991). Relativně dlouhá latence vzniku T-ALL a klonální povaha onemocnění však naznačují, že je zapotřebí dalších mutací k rozvoji leukemického klonu (Rakowski et al., 2011). Ve studii De Keersmaecker et al. (2010) bylo zjištěno, že u leukemií indukovaných změnami *TLX1* genu se numerické odchylky vyskytují se zvýšenou frekvencí, což může znamenat, že aberace v *TLX1* způsobují abnormality v mitotickém aparátu. Výsledky také poukazují na spojení aberantní exprese genu *TLX1* s vývojem

chromosomové instability v nejranějších stádiích transformace T-buněk (De Keersmaecker et al., 2010).

Gen *TLX3* (dříve znám jako *HOX11L2*) v oblasti 5q35.1 se podílí na regulaci vývoje mozku během embryogeneze. Nejčastější změnou postihující *TLX3* je translokace t(5;14)(q35;q32), která se objevuje u 20–25 % pediatrické T-ALL. Během této aberace je *TLX3* translokován do oblasti T-buněčných regulačních sekvencí v blízkosti lokusu *BCL11B*. Přestavbou dochází k abnormální aktivaci genu *TLX3* (Bernard et al., 2001). Role nadměrné exprese genu *TLX3* v organismu zatím není známa (Van Vlierberghe and Ferrando, 2012). Pouze výjimečně dochází k translokaci *TLX3* genu do lokusu některého z *TCR* (Bernard et al., 2001).

Aberace genů *TLX1* a *TLX3* mají podobný mechanismus buněčné transformace, (např. výsledkem změn v genech *TLX1* a *TLX3* je téměř shodná míra jejich genové exprese). Navíc existují specifické genové mutace, které se vyskytují nejčastěji u leukemií podmíněnými změnami v *TLX1* a *TLX3*, např. vzácná fúze *NUP214-ABL1* a mutace tumor-supresorů *PTPN2*, *WT1* a *PHF6* (Van Vlierberghe and Ferrando, 2012).

Přítomnost abnormální exprese genu *TLX1* je dle literatury spojována s lepší prognózou a se sníženým rizikem relapsu (Ferrando et al., 2002, 2004), naopak aberantní exprese *TLX3* je spjata s horší prognózou a vyšším rizikem vzniku relapsu (Baak et al., 2008). V recentní studii dle Olshanskaya et al. (2019) měly pacienti s aberacemi v genech *TLX1* a *TLX3* horší prognózu než pacienti s normálním karyotypem (Olshanskaya et al., 2019).

2.3.1.4 Další genetické změny

U T-ALL můžeme najít celou řadu dalších genetických změn. Mezi nejčastější patří delece krátkých ramen chromosomu 6 ve 20 % případů (Karrman and Johansson, 2017), aberace genů *TAL1* u zhruba 30 % pacientů (Huret, 2001; Hagemeijer and Graux, 2010) a *LMO2* u 5–10 % nemocných (Bilhou-Nabera, 2011).

Přestože byly delece na 6p určeny jako aberace spjaté s T-ALL již v 70. letech 20. století, stále nejsou přesně známy konkrétní geny v této oblasti, které by měly významný vliv na rozvoj tohoto onemocnění (Karrman and Johansson, 2017). Nicméně jednou z nejčastěji deletovaných oblastí je 6p15-16, kde se nacházejí 3 kandidátní geny, jedná se o *CASP8AP2*, *EPHA7* a *GRIK2*. Předpokládá se, že tyto geny jsou možnými TSG, jež jsou důležité v iniciaci nádorové transformace u T-ALL (Sinclair et al., 2004; Remke et al., 2009; López-Nieva et al., 2012). Ve studii dle Gachet et al. (2018) jsou delece v oblasti

6q spojovány s horší prognózou. V této studii byly identifikovány dva chybějící geny na 6q14 a to *SYNCRIP* a *SNHG5*, které se účastní regulace maturace a translace RNA. Bylo zjištěno, že pokud jsou oba geny zároveň inaktivovány, leukemogeneze je výrazně urychlena, čímž se potvrdila jejich tumor-supresorová povaha (Gachet et al., 2018). Na chromosomu 6 dochází mimo jiné vzácně i ke zmnožení genu *MYB* v oblasti 6q23 (Clappier et al., 2007).

Gen *TALI* (dříve nám jako *TCL5*) v oblasti 1p33 je důležitý regulátor vývoje hematopoetických kmenových buněk exprimovaných v hematopoetických progenitorech, konkrétně v mastocytech a progenitorech erytrocytů a megakaryocytů. Při nadměrné expresi *TALI* dochází k zastavení v pozdní fázi vývoje thymocytů. U 6–30 % dětí s T-ALL se vyskytuje malá intrachromosomová delece, při které dochází k přesunu *TALI* pod vliv promotoru sousedícího genu *STIL*, který vykazuje vysokou míru exprese v T-buňkách. Výsledkem této fúze je aberantní gen *STIL/TALI*. Kromě toho u 3 % dětských T-ALL dochází k translokaci t(1;14)(p32;q11), během které je gen *TALI* translokován pod vliv enhancerů *TRA/TRD* v oblasti 14q11.2 a vzácně i k t(1;7)(p32;q34), kdy je přesunut do lokusu *TRB* v oblasti 7q35 (Huret, 2001; Hagemeijer and Graux, 2010). Dle literatury jsou přestavby *TALI* spojována s spíše lepší prognózou pacientů (Cave et al., 2004; Olshanskaya et al., 2019).

V 5–10 % případů vyskytují translokace t(11;14)(p13;q11) a t(7;11)(q35;p13). V prvním případě se v oblasti zlomu 11p13 se nachází transkripční faktor *LMO2*, který je v důsledku této aberace přesunut do lokusu *TRA/TRD*, v druhém je *LMO2* přemístěn do lokusu *TRB* (Bilhou-Nabera, 2011). Obdobným mechanismem dochází u zhruba 2 % pacientů během t(8;14)(q24;q11) k přesunu onkogenu *MYC* z oblasti 8q24 do blízkosti lokusu *TRA/TRD* (Boyer, 2001).

Mezi další změny u T-ALL patří inaktivace/delece genů *RBI*, *PHF6*, transkripčních faktorů *LEF1*, *WT1*. Dále se vyskytují inaktivační mutace nebo delece genů, jejichž produkty jsou tzv. signální molekuly, např. *DNM2*, *PTEN*, nebo naopak jejich aktivace, např. *IL7R*, *NRAS* (Girardi et al., 2017). Recentní studie se zaměřují na studium souvislosti T-ALL s např. aberantní expresí genu *MEF2C*, mutacemi onkogenů a TSG typických pro AML (akutní myeloidní leukemie) a inaktivací důležitých transkripčních faktorů *RUNX1*, *GATA3*, a *ETV6* (Van Vlierberghe et al., 2011; Zhang et al., 2012).

Tabulka 2. Nejčastější změny v T-ALL.

Gen/oblast	Funkce	Typ aberace	%	Refer.
<i>CDKN2A/</i> <i>CDKN2B</i> (9p21)	Regulace buněčného cyklu	Delece 9p21	50–70	3,7,11 ,12
<i>TCR</i> (14q11.2, 7q34, 7p14)	Kóduje T-buněčný receptor	Translokace a inverze	30	10
<i>TAL1</i> (1p33)	Regulace vývoje hematopoetických kmenových buněk	Intrachromosomová přestavba 1p33	6–30	7,9
		t(1;14)(p32;q11)	3	
<i>TLX3</i> (5q35.1)	Vývoj mozku během embryogeneze	t(5;14)(q35;q32)	20–25	2
6p	-	Delece	20	1,6,12
11q	-	Delece	5–10	1,6,12
12p	-	Delece	5–10	1,6,12
<i>LMO2</i> (11p13)	Vývoj hematopoetických kmenových buněk	t(11;14)(p13;q11), t(7;11)(q35;p13)	5–10	8
Chromosom 8	-	Trisomie	5–10	1,6,12
<i>ABL1</i> (9q34)	Opravy DNA, organizace cytoskeletu, buněčná adheze, proliferace a apoptóza	Genová fúze (<i>NUP214-ABL1</i>)	8 (5)	4,7
<i>TLX1</i> (10q24.31)	Vývoj sleziny během embryogeneze	t(10;14)(q24;q11), t(7;10)(q35;q24)	4–8	11,13

Reference: 1 - Schneider et al., 2000, 2 - Bernard et al., 2001, 3 - Ferrando et al., 2002, 4 - Ballerini et al., 2005, 5 - Graux et al., 2009, 6 - Karrman et al., 2009, 7 - Hagemeijer and Graux, 2010, 8 - Bilhou-Nabera, 2011, 9 - Huret, 2011, 10 - Le Noir et al., 2012, 11 - Girardi et al., 2017, 12 - Karrman and Johansson, 2017, 13 - Gindina and Beel, 2018

2.4 METODY DETEKCE CHROMOSOMOVÝCH ABERACÍ

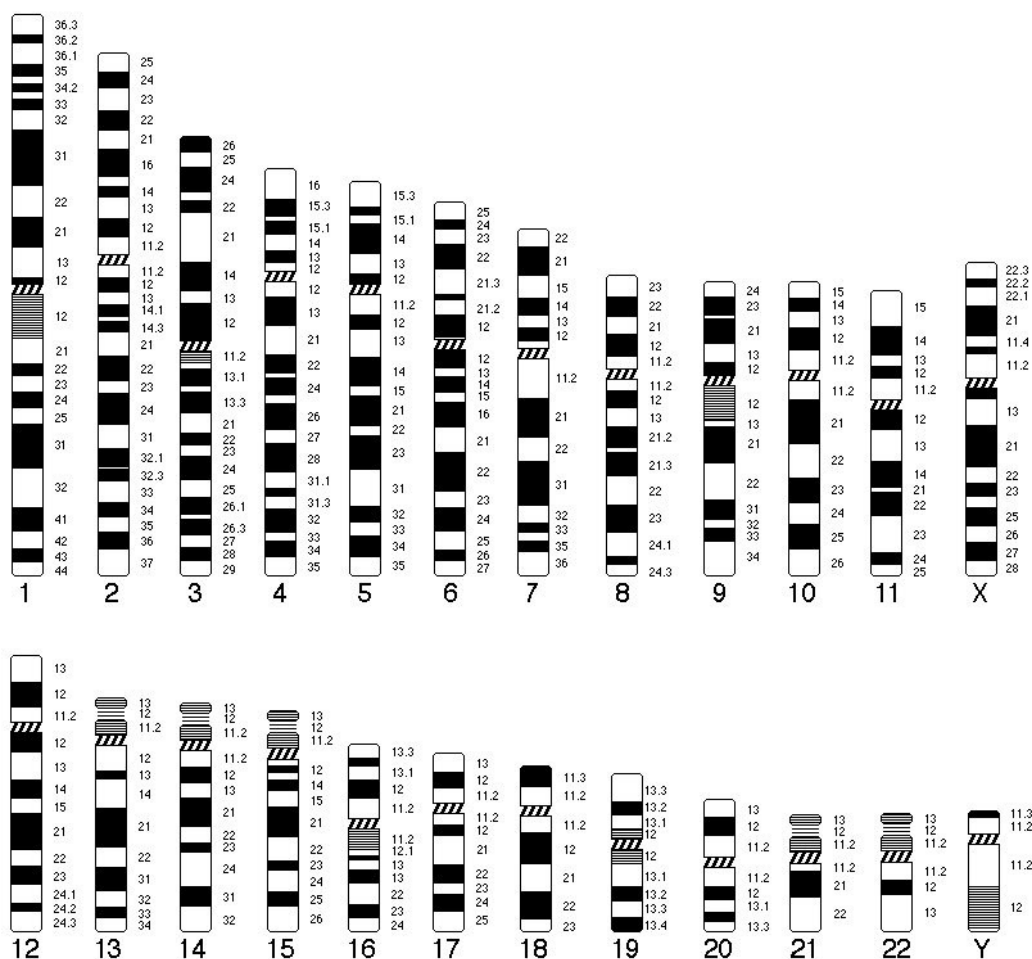
Přítomnost chromosomových abnormalit se u hematologických malignit nejčastěji vyšetřuje v buňkách kostní dřeně. Pokud není možné odebrat vzorek kostní dřeně a dochází k infiltraci nádorových buněk do krevního oběhu, lze využít i periferní krev. Vzorek této tkáně musí obsahovat nádorové nebo potencionálně nádorové buňky schopné buněčného dělení. Cílem vyšetření je sestavit karyotyp a určit, zda došlo k jeho změnám.

Základní metodou pro detekci chromosomových aberací je klasická cytogenetická analýza pruhovaných chromosomů. Pro doplnění výsledků konvenčního karyotypování byly vyvinuty molekulárně cytogenetické metody, které pomáhají upřesnit výsledky klasické cytogenetické analýzy. Jejich princip spočívá v přirozené schopnosti denaturace a renaturace nukleových kyselin. Tyto metody se využívají pro cílenou detekci chromosomových změn, k přesnému určení zlomových míst na chromosomech nebo k určení původu marker chromosomů. Základními molekulárně-cytogenetickými metodami jsou FISH, mFISH, mBAND, čipové technologie a MLPA (Michalová et al., 2001).

2.4.1 Klasická cytogenetická analýza

Klasická cytogenetická analýza je založena na kultivaci a zpracování buněk získaných ze vzorku nádorové tkáně, přípravě a barvení chromosomových preparátů a jejich analýze ve světelném mikroskopu. Buňky z odebraného vzorku jsou kultivovány v růstovém médiu. Buněčné dělení je nutné zastavit ve stádiu metafáze, kdy jsou chromosomy dostatečně spiralizované a jsou tak dobře viditelné ve světelném mikroskopu. K tomu se využívá inhibitor růstu mikrotubulů, tzv. kolcemid (kolchinin), který naruší tvorbu dělicího vřeténka a zamezí tak dalšímu průběhu buněčného dělení. Dále se používá hypotonický roztok, který naruší buněčnou membránu, čímž se docílí prostorového rozprostření chromosomů. Nakonec je třeba chromosomy fixovat. Důležitým krokem klasické cytogenetické analýzy je barvení chromosomů. V současnosti patří mezi nejvyužívanější metody barvení tzv. G-pruhování. G-pruhy (Obrázek 3) jsou unikátní pro každý chromosomový pár a s jejich pomocí lze ve světelném mikroskopu identifikovat jednotlivé chromosomy a případně jejich přestavby. Díky této metodě je možné hodnotit při jednom vyšetření všechny chromosomové aberace v buňce a analyzovat veškeré heterogenní buněčné klony. Nevýhodou je nízká citlivost této metody (~5 Mb). U nádorových buněk je také častá velmi špatná kvalita chromosomů a nízká proliferativní aktivita *in vitro*. U dětí s ALL nastává často další problém v podobě nízkého mitotického

indexu, což je poměr nedělících se buněk a buněk, u nichž probíhá mitóza (Ritterbach et al., 1998; Michalová, 1999; Michalová et al., 2001; Zemanová et al., 2019).

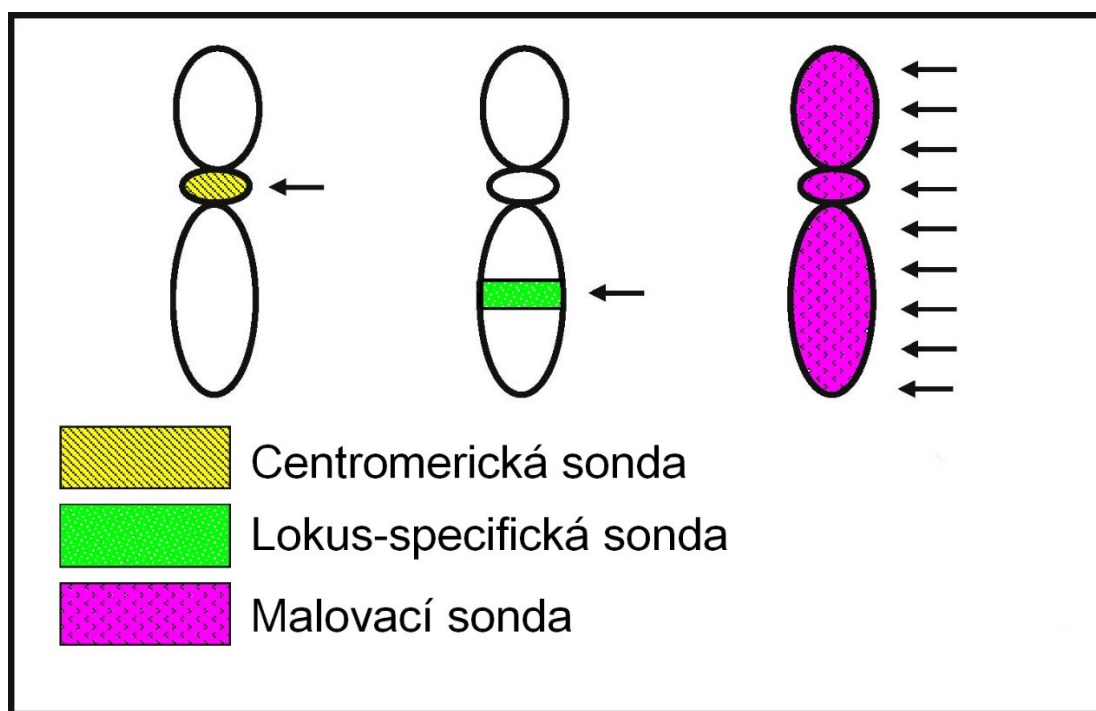


Obrázek 3. Schématické znázornění G-pruhů na lidských chromosomech (tzv. ideogram). Převzato z ISCN (2016).

2.4.2 FISH

Metoda FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace) je založena na denaturaci zkoumané DNA a následné hybridizaci s fluorescenčně značenými DNA sondami. Při hybridizaci dochází ke spojení původního vlákna DNA s cizím vláknem, v tomto případě DNA sondou. DNA sondy jsou specifické úseky DNA, které jsou komplementární k vyšetřované oblasti na chromosomu. Existují tři základní typy sond (Obrázek 4). Centromerické sondy jsou specifické a hybridizují k α -satelitní DNA lokalizované v centromerách jednotlivých chromosomů. Tyto sondy se využívají hlavně k odhalení numerických odchylek v mitózách i interfázních jádrech. Dále je možné je aplikovat k určení původu centromery u marker chromosomu. Lokus-specifické sondy jsou

komplementární k jedinečné genové sekvenci nebo lokusu a používají se k detekci strukturních aberací a přímé lokalizaci genů na chromosomech. Malovací sondy obsahují sekvence z celých chromosomů. Vážou se k celému chromosomu a mají využití pro analýzu strukturních aberací většího rozsahu. Tento typ sond však není vhodný pro analýzu interfázních jader, protože výsledné fluorescenční signály jsou příliš rozptýlené. Rozlišení této metody je až ~100 kb (Zemanová et al., 2019).



Obrázek 4. Znáznornění tří typů DNA sond. Převzato a upraveno dle Bridge (2008).

Prvním krokem je nanesení hybridizační směsi na preparát, poté dojde k denaturaci sondy a vyšetřované DNA zahřátím na vysoké teploty (zhruba 70–80 °C), následně se preparát ochladí (37 °C), aby mohla správně proběhnout hybridizace sondy s komplementárním úsekem zkoumané DNA. Nakonec se na preparát nanese DAPI, což je fluorescenční barvivo, které se váže na DNA. DAPI slouží k obarvení celých chromosomů a interfázních jader. Výhoda této metody je možnost využití i nedělících se interfázních jader, odhalení strukturních i numerických změn, rychlost získání výsledku (2–24 h), vysoká specifita a možnost analýzy několika sekvencí zároveň. Tato metoda je cílená a proto nezískáme informace o celém genomu (Michalová, 1995; Michalová et al., 1996, 2001).

2.4.3 mFISH

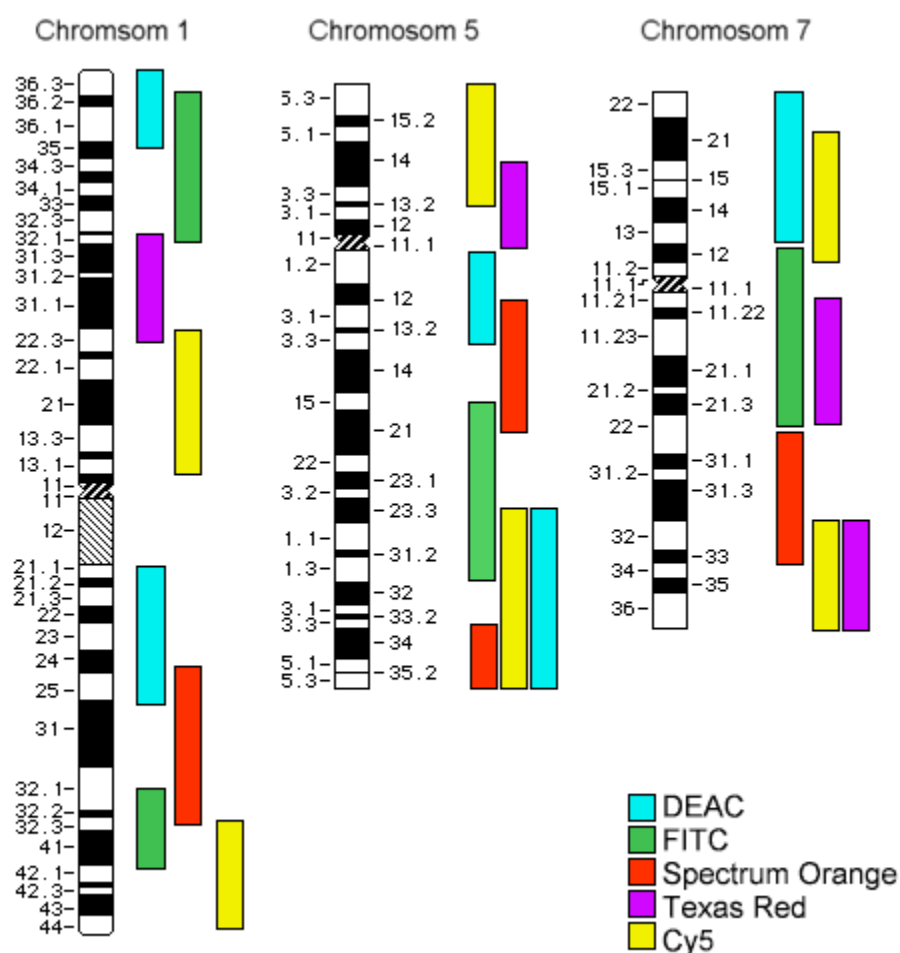
mFISH (mnohobarevná fluorescenční *in situ* hybridizace) je metoda odvozená od metody FISH. Rozdílem je, že využívané malovací sondy jsou značeny kombinací fluorochromů. K zobrazení všech chromosomů u člověka (22 párů gonosomů a 2 autosomy) je třeba použít alespoň 5 fluorochromů. Každému chromosomu je přiřazena unikátní kombinace těchto fluorochromů (Obrázek 5). Po nasnímání pomocí CCD kamery (charged coupled device) přes sadu šesti fluorescenčních filtrů je speciální počítačový software schopen změřit intenzitu jednotlivých fluorescenčních signálů a následně přiřadit každému chromosomu unikátní klasifikační barvu (pseudobarvu) (Michalová et al., 2001). Metoda poskytuje ucelený přehled o celém karyotypu. Nejčastěji využíváme mFISH při zjišťování původu marker chromosomu, pro detekci nebalancovaných translokací a analýzu komplexních přestaveb. Nevýhodou této metody je, že k hodnocení chromosomových aberací můžeme využít pouze mitózy. Chromosomy jsou obarveny jednolitě, proto není možné identifikovat přesná zlomová místa strukturních přestaveb. Citlivost mFISH je cca 5 Mb (Mackinnon and Chudoba, 2011).

	Značení				
	Aqua	Green	Orange	Red	Near Infrared
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					
X					
Y					

Obrázek 5. Poměry značených sond pro jednotlivé chromosomy dle MetaSystems.

2.4.4 mBAND

Další metodou odvozenou od FISH je mBAND (mnohobarevné pruhování s vysokou rezolucí). DNA pro přípravu sond (Obrázek 6) pro tuto metodu se získává nejčastěji mikrodisekcí přímo z cytogenetického preparátu. Takto získaná DNA je dále amplifikována a štěpena na různě dlouhé fragmenty, které se vzájemně překrývají a následně jsou značeny pomocí jednoho z pěti fluorochromů. Počítačový software nepřirazuje pseudobarvu celým chromosomům, ale jen jeho částem (pruhům). Výsledkem vyšetření je jeden chromosomový pár, na kterém můžeme detailně odlišit jednotlivé pruhy a přesně tak určit zlomová místa. Jedná se tedy o cílenou metodu a pro její využití je třeba předem znát konkrétní změny karyotypu, které chceme analyzovat. Tato metoda neposkytuje informace o všech chromosomech v karyotypu zároveň, ale jsme schopni identifikovat přesná místa zlomu na chromosomech, určit původ translokovaných částí chromosomů, odhalit pericentrické a paracentrické inverze a další strukturní aberace (Chudoba et al., 1999). Rozlišení této metody je ~5 Mb (Zemanová et al., 2019).



Obrázek 6. Schéma sond mBAND pro chromosomy 1, 5 a 7. Převzato z http://www.miszalok.de/Lectures/L16_Fish/Fish_english.htm.

2.4.5 Array CGH

Array CGH (komparativní genomová hybridizace na mikročipech) je metoda umožňující analyzovat celý genom v rámci jedné hybridizace s vysokou rozlišovací schopností až 40 Mb. Díky tomu lze detekovat kryptické aberace, které nejsou zachytitelné klasickou cytogenetickou analýzou ani ostatními molekulárně cytogenetickými metodami, včetně přesného místa zlomů na chromosomech. Tyto výsledky ale nevidíme v kontextu chromosomů, proto nelze určit, zda došlo k zisku či ztrátě genetického materiálu v důsledku nebalancovaných strukturních přestaveb nebo prostých delecí či amplifikací (Shaffer et al., 2007; Mackinnon and Chudoba, 2011). Zachytitelné nebalancované změny musí být přítomny alespoň v 15–20 % klonu (Zemanová et al., 2019).

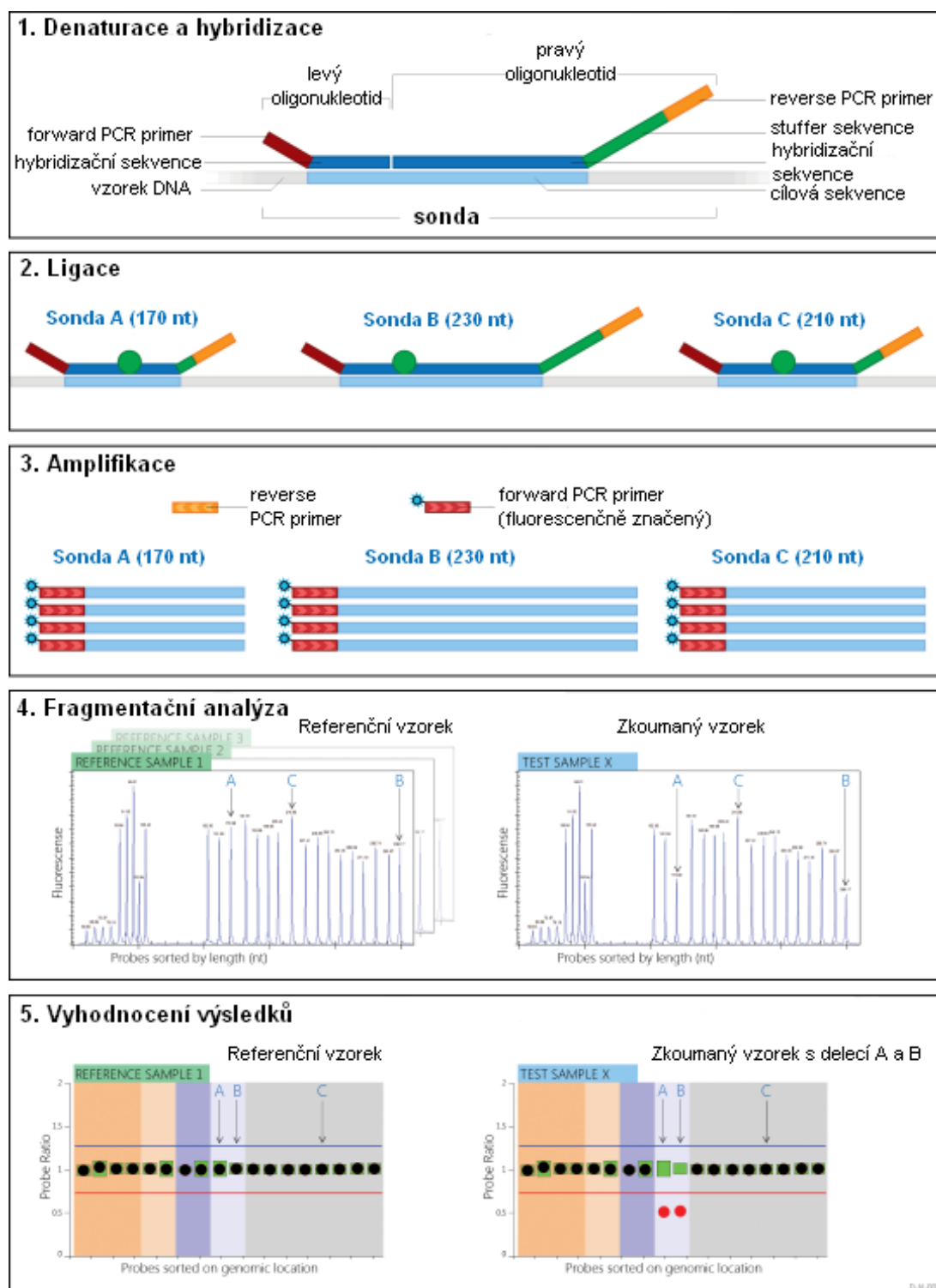
Při této metodě je směs rozdílně značené zkoumané a referenční DNA smíchaná v poměru 1:1 hybridizována na tzv. mikročip (array), což je speciálně upravená plastová nebo skleněná destička, na které jsou ukotveny jednotlivé oligonukleotidy (próby). Tímto způsobem mohou být na čipu umístěny v jednotlivých spotech až tisíce genů, případně i celý genom. Po hybridizaci zkoumané a referenční DNA jsou čipy naskenovány pomocí laserového skeneru a speciální počítačový software následně hodnotí poměr a intenzitu fluorescenčních signálů v jednotlivých spotech. Pokud převládá barva signálu, kterým byla značena zkoumaná DNA, pak došlo k zisku genetického materiálu. Pokud naopak převládá barva signálu, která odpovídá barvě značení referenční DNA, pak došlo ke ztrátám DNA sekvencí (Solinas-Toldo et al., 1997). Tato metoda je vysoce citlivá, její rozlišení je ~20–200 kb (Zemanová et al., 2019).

2.4.6 MLPA

Metoda MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) je multiplexní polymerázová řetězová reakce, která umožňuje odhalit abnormální počet genových kopií až u 60 různých DNA sekvencí s vysokou rozlišovací schopností až 64 nt (MRC-Holland, 2019). Je vhodná k odhalení numerických změn, delecí, duplikací a dalších nebalancovaných chromosomových aberací (Schouten et al., 2002; Fernández et al., 2005).

MLPA sestává z 5 základních kroků – denaturace a hybridizace, ligace, amplifikace, fragmentační analýzy a vyhodnocení výsledků (Obrázek 7). K hybridizaci se zkoumanou DNA se využívají speciální MLPA sondy, což jsou dva rozdílné oligonukleotidy obsahující PCR primer. Ligaci zajišťuje specifický enzym DNA ligáza, která je schopná spojovat jen ty sondy, u kterých došlo v předchozím kroku k hybridizaci se zkoumanou sekvencí. Pouze správně zligované produkty jsou exponenciálně

amplifikovány PCR reakcí. Ke vzorku se následně přidá polymeráza, volné nuklotidy a forward a reverse primery, aby mohla proběhnout PCR reakce. Na rozdíl od klasické PCR při MLPA nejsou amplifikovány cílové sekvence, ale MLPA sondy, které na ně hybridizují, proto stačí přidat pouze jeden pár univerzálních primerů. Amplifikovaný produkt je analyzován pomocí kapilární elektroforézy, jejíž výsledky jsou následně hodnoceny v počítači pomocí speciálního softwaru. Výsledkem je specifický elektroforeogram, na kterém relativní výška každého píku individuálních sond ve srovnání s relativní výškou píků sond v různých referenčních vzorcích DNA odráží relativní počet kopií, které odpovídají cílové sekvenci ve vzorku. Relativní snížení výšky píku je výsledkem delece jedné nebo více cílových sekvencí, naopak jeho relativní zvýšení odráží duplikaci (MRC-Holland, 2019).



Obrázek 7. Znázornění základních kroků metody MLPA. 1. Denaturace/hybridizace – levý a pravý oligonukleotid (sonda) se vážou k cílové sekvenci DNA. 2. Ligace – hybridizované sondy jsou ligovány pomocí ligázy. 3. Amplifikace – ligované sondy jsou amplifikovány pomocí jednoho páru primerů. 4. Fragmentační analýza – PCR produkty jsou rozděleny podle délky. 5. Vyhodnocení výsledků – analýza pomocí počítačového souboru Coffalyzer.Net. Převzato a upraveno z https://www.mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=_hS-AvFINWhkPMYt9ZIZdCx7-VkDGgJqQ1uzZmJTgWTQ./

3 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo:

- Provést detailní retrospektivní a prospektivní analýzu genomu buněk kostní dřeně u dětí s T-ALL pomocí kombinace molekulárně cytogenomických metod
- Určit frekvenci nejčastějších rekurentních kryptických chromosomových aberací
- Posoudit jejich význam pro prognózu onemocnění
- Identifikovat aberace spojené s vyšším rizikem relapsu

4 MATERIÁL

4.1 VYŠETŘENÝ SOUBOR NEMOCNÝCH

Vyšetřili jsme diagnostické vzorky kostní dřeně 67 dětí s potvrzenou T-ALL diagnostikované v letech 1996–2017. Vzorky pro prospektivní a retrospektivní analýzu pocházely z archivu vzorků Centra nádorové cytogenetiky ÚLBD, VFN a 1. LF. Celkem se jednalo o 19 dívek a 48 chlapců (poměr pohlaví 28 % dívek : 72 % chlapců). Medián věku v době stanovení diagnózy byl 8 let (průměrný věk 9,2 let).

4.2 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY PRO KLASICKOU CYTOGENETICKOU ANALÝZU

Chemikálie:

- 2× SSC (lékárna VFN)
- Fetální telecí sérum (Sigma Aldrich)
- Giemsa solution (Merck)
- HCl (0,2 M) (lékárna VFN)
- Heparin (lékárna VFN)
- KCl (0,075 M) (lékárna VFN)
- KH₂PO₄ (Lachema)
- Kolcemid (CIBA)
- MarrowGrow Medium (Cytogen GmbH)
- Kyselina octová (Penta)
- L-glutamin (lékárna VFN)
- Methanol (Penta)
- Na₂HPO₄ × 2 H₂O (Fluka)
- Imerzní olej (Zeiss)
- PBS (lékárna VFN)
- Penicilin G Biotika Drasel. Sul (lékárna VFN)
- Referenční pufry 4, 7, 10 (Fluka)
- Destilovaná voda
- Wrightovo barvivo

Roztoky:

- Odběrové médium
300 ml PBS
3,6 ml heparinu
- Hypotonický roztok
2,796 g 0,075 M KCl
500 ml destilovaná voda
- Fixační roztok
Kyselina octová : methanol v poměru 1 : 3
- Barvicí roztok A
5,34 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ + 500 ml destilovaná H_2O
- Barvicí roztok B
 KH_2PO_4 + 500 ml destilovaná H_2O
3 ml Giemsa add
- Sørensenův pufr
49 ml roztoku A + 51 ml roztoku B
- Barvicí roztok
2,5 g Wrightovo barvivo + 1000 ml methanolu

4.3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY PRO FISH

Chemikálie:

- 2× SSC (lékárna VFN)
- Rubber cement (Marabu)
- DAPI/antifade (Vector)
- Vysis LSI Hybridization Buffer (Abbott Molecular)
- Destilovaná voda
- Fluorescenčně značené DNA sondy (Dako, Abbott)
- Imerzní olej (Carl Zeiss)

Roztoky:

- Alkoholová řada:
70% alkohol (58 ml 95% ethanolu, 22 ml destilované H_2O)
85% alkohol (70,5 ml 95% ethanolu, 9,5 ml destilované H_2O)
95% ethanol (lékárna VFN)

- Mycí roztoky:
0,4× SSC/0,3 % NP40 (50 ml 20× SSC, 488,5 ml destilované H₂O,
1,5 ml NP40)
2× SSC/0,1% NP40 (50 ml 20× SSC, 449,5 ml destilované H₂O,
0,5 ml NP40)

4.4 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY PRO IZOLACI DNA

QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen)

- 20 µl Proteináza K
- 200 µl AL pufr
- 200 µl 96–100% EtOH
- 500 µl AW1 pufr
- 500 µl AW2 pufr
- 55 µl AE pufr

4.5 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY PRO MLPA

- TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0 + 0.1 mM EDTA)
- Hybridizační master mix (3 µl/vzorek)
 - 1,5 µl/vzorek MLPA buffer (MRC-Holland)
 - 1,5 µl/vzorek SALSA MLPA P335 ALL-IKZF1 Probemix (MRC-Holland)
- Ligační master mix (32 µl/vzorek)
 - 3 µl/vzorek Ligase-65buffer A (MRC-Holland)
 - 3 µl/vzorek Ligase-65buffer B (MRC-Holland)
 - 25 µl/vzorek Nuclease-free H₂O
 - 1 µl/vzorek Ligase 65 (MRC-Holland)
- Polymerázový mix (10 µl/vzorek)
 - 2 µl/vzorek SALSA PCR primer (MRC-Holland)
 - 7,5 µl/vzorek Nuclease-free H₂O
 - 0,5 µl/vzorek Polymeráza (MRC-Holland)
- Formamid
- 500 LIZ size Standard (MRC-Holland)

5 METODY

5.1 KLASICKÁ CYTOGENETICKÁ ANALÝZA

5.1.1 Kultivace buněk kostní dřeně

1. Vzorek cca 0,5 ml kostní dřeně byl odebrán do sterilní zkumavky s odběrovým médiem připraveným v naší laboratoři
2. Vzorek jsme centrifugovali 5 min při 2000 otáčkách/min
3. Odsáli jsme vrstvu buněk s lymfocyty (cca 1 ml) a převedli do zkumavky s kultivačním médiem
4. Kultivovali jsme v termostatu při 37 °C po dobu 24 h
5. Po kultivaci jsme přidali 0,1 ml kolcemidu (0,276 µl/ml média) a inkubovali při 37 °C po dobu 1 h
6. Centrifugovali jsme při pokojové teplotě (PT) po dobu 5 min při 2000 otáčkách/min
7. Odsáli jsme supernatant a resuspendovali sediment v hypotonickém roztoku (5–10 ml 0,075 M KCl)
8. Buněčnou kulturu jsme inkubovali v termostatu při 37 °C po dobu 20 min
9. Centrifugovali jsme po dobu 5 min při 2000 otáčkách/min
10. Odsáli jsme supernatant, k sedimentu přidali za stálého třepání po kapkách čerstvě připravený fixační roztok (methanol a kyselina octová v poměru 3 : 1) a resuspendovaný sediment opět centrifugovali po dobu 5 min při 2000 otáčkách/min.
Krok číslo 10 jsme opakovali zhruba 5×, dokud nebyl roztok čirý. Pro kroky 6.–10. jsme používali automat pro zpracování buněčných kultur CellSprint (Genial Genetics).
11. Po poslední fixaci jsme vzniklou směs uchovali v lednici při 4–7 °C do druhého dne
12. Druhý den jsme centrifugovali suspenzi po dobu 5 min při 2000 otáčkách/min a PT
13. Odsáli jsme supernatant a resuspendovali sediment ve fixačním roztoku (množství fixačního roztoku závisí na hustotě buněčné suspenze)

5.1.2 Příprava preparátu

1. Takto připravenou buněčnou suspenzi jsme pomocí automatu pro kontrolu teploty a vlhkosti Hanabi Metaphase Spreader (ADS BIOTEC) nakapali na připravené podložní sklo a nechali zaschnout na vzduchu při pokojové teplotě. Kvalitu a rozložení chromosomů a hustotu jader na preparátu jsme hodnotili ve světelném mikroskopu a případně upravili ředěním
2. Zpracované preparáty jsme vložili do krabic na mikroskopická skla a uchovali je při pokojové teplotě, zbývající buněčná suspenze byla uchována v mrazáku při -18 až -20 °C

5.1.3 Barvení preparátů

1. Preparáty jsme inkubovali v roztoku 0,2 M HCl po dobu 5 min při PT a v roztoku $2\times$ SSC při 60 °C po dobu 20 min
2. Preparáty jsme dali do horizontální polohy, přelili připraveným barvicím roztokem (3 ml Sørensenova pufru a 1 ml Wrightova barviva) a nechali působit 3–5 min
3. Skla jsme opláchli pod tekoucí vodou a nechali oschnout na vzduchu při pokojové teplotě
4. Intenzitu barvení chromosomů jsme zkontrolovali ve světelném mikroskopu a případně znovu barvili, nebo naopak odbarvili v methanolu a opět barvili s kratší dobou působení

5.1.4 Analýza karyotypu

Obarvené preparáty jsme hodnotili ve světelném mikroskopu Axioskop (Zeiss). U každého pacienta jsme analyzovali alespoň 20 mitóz (pokud byly na preparátu přítomny) pod objektivem se zvětšením $1000\times$. U abnormálních karyotypů jsme určili numerické a strukturní změny chromosomů, které jsme popsali dle mezinárodní cytogenomické nomenklatury ISCN (2016).

5.2 FISH

Při analýze metodou FISH jsme využívali komerční přímo značené DNA sondy od výrobců Dako a Abbott. Postupovali jsme podle protokolů doporučených výrobcem. Sondy jsme uchovávali v mrazicím boxu při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Pro přípravu preparátů pro FISH analýzu jsme využívali fixované buněčné suspenze připravené stejným způsobem jako pro klasickou cytogenetickou analýzu. Preparáty pro FISH jsme kapali den před provedením hybridizace.

5.2.1 Denaturace a hybridizace

1. Podložní skla připravená podle postupu pro klasickou cytogenetickou analýzu jsme inkubovali po dobu 20 min v roztoku $2\times\text{SSC}$, $\text{pH} = 7$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$
2. Připravené preparáty jsme následující den dehydratovali ve vzestupné alkoholové řadě (70 %, 85 %, 95 %) po 2 minutách. Využili jsme naředěné sondy od výrobce (Dako: $10\text{ }\mu\text{l/vzorek}$) a nenaředěné sondy ředili podle doporučení výrobce (Abbott: $1\text{ }\mu\text{l sondy} + 2\text{ }\mu\text{l vody} + 7\text{ }\mu\text{l pufru} = 10\text{ }\mu\text{l/vzorek}$)
3. Hybridizační směs jsme nanесли na preparát, překryli krycím sklem, které jsme fixovali Rubber cementem
4. Preparát s nanesenou sondou jsme denaturovali a hybridizovali v automatických přístrojích ThermoBrite System (Abbott, Leica) a HYBrite (Vysis) podle doporučení výrobce sondy:
Dako: denaturace $85\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 min; hybridizace $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, přes noc
Abbott Molecular: denaturace $73\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2 min; hybridizace $42\text{ }^{\circ}\text{C}$, přes noc
5. Následující den jsme odstranili krycí sklo s Rubber cementem a preparát omyli v mycím roztoku
 $2\text{ min v } 0,4\times\text{SSC}/0,3\text{ }\%\text{ NP40 při } 73\text{ }^{\circ}\text{C}$
 $1\text{ min v } 2\times\text{SSC}/0,1\text{ }\%\text{ NP40 při PT}$
6. Dehydratovali jsme preparát po 2 min ve vzestupné alkoholové řadě: 70 %, 85 %, 95 %
7. Nechali jsme preparát oschnout ve tmě při PT. Pro kroky 5.–7. jsme využili automat pro mytí a barvení preparátů VP 2000 (Abbott)
8. Nanesli jsme DAPI/antifade a překryli krycím sklem $22 \times 60\text{ mm}$

5.2.2 Mikroskopická analýza

K analýze preparátů jsme použili fluorescenční mikroskop Axio Imager 1 (Zeiss) vybavený optickými filtry pro detekci specifických fluorochromů. U každého pacienta jsme hodnotili alespoň 20 mitóz (pokud byly na preparátu přítomny) a 200 interfázních jader pod imerzním objektivem se zvětšením 1000×. Každý vzorek hodnotily nezávisle dvě osoby, přičemž každá zhodnotila alespoň 10 mitóz a 100 jader. Nálezy jsme popsali podle závazné mezinárodní nomenklatury ISCN (2016). Hladina cut off pro detekci ztrát/delecí byla stanovena na 5 %, pro zisky/přestavby na 2,5 %.

5.3 IZOLACE DNA

DNA jsme izolovali ze vzorku kostní dřeně. Pro izolaci DNA jsme využili QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen).

5.3.1 Postup práce

1. Ke vzorku kostní dřeně jsme přidali 20 µl Proteinázy K a 200 µl AL pufru
2. Vzorek jsme inkubovali při 56 °C po dobu 10 min
3. Ke vzorku jsme přidali 200 µl 96–100 % EtOH
4. Vzorek jsme centrifugovali ve sterilní kolonce 6000 g po dobu 1 min
5. Přidali jsme 500 µl AW1 pufru
6. Centrifugovali jsme 6000 g po dobu 1 min
7. Přidali jsme AW2 pufr
8. Centrifugovali jsme 20 000 g po dobu 3 min
9. Vylili jsme obsah kolonky
10. Centrifugovali jsme na sucho 20 000 g po dobu 1 min
11. Eluovali jsme do čisté mikrokumavky 55 µl AE pufru
12. Inkubovali jsme při PT po dobu 5 min
13. Centrifugovali jsme 6000 g po dobu 1 min
14. Vzorky jsme následně spektrofotometricky změřili a určili jejich koncentraci a čistotu

5.4 MLPA

Pro metodu MLPA jsme využili komerční kit SALSA MLPA P335 ALL-IKZF1 probemix (MRC-Holland).

5.4.1 Denaturace

1. Protřepali a centrifugovali jsme vzorky izolované DNA
2. Rozpustili jsme vypočítaný objem vzorku DNA s vypočítaným objemem TE tak, aby DNA měla koncentraci 70 ng/μl (5 μl do 0,2 ml eppendorfky)
3. Vzorky jsme vložili do termocycleru a nechali denaturovat při 98 °C po dobu 10 min

5.4.2 Hybridizace

1. Protřepali a centrifugovali jsme jednotlivé komponenty hybridizačního master mixu
2. Připravili jsme hybridizační master mix (1,5 μl/vzorek MLPA buffer + 1,5 μl/vzorek Probemix = 3 μl/vzorek)
3. Hybridizační master mix jsme protřepali a centrifugovali
4. Pipetou jsme hybridizační master mix přidali do denaturovaných vzorků (3 μl/vzorek) v termocycleru a pipetou promíchali
5. V termocycleru jsme nechali hybridizovat:
95 °C.....1 min
60 °C.....16–20 h
54 °C.....∞

5.4.3 Ligace

1. Protřepali a centrifugovali jsme Ligase-65buffer A a Ligase-65buffer B
2. Připravili jsme ligační master mix (3 μl/vzorek Ligase-65buffer A + 3 μl/vzorek Ligase-65buffer B + 25 μl/vzorek Nuclease-free H₂O + 1 μl/vzorek Ligase 65 = 32 μl/vzorek) a pipetou promíchali
3. Pipetou jsme přidali 32 μl ligačního master mixu do každého vzorku a pipetou promíchali při 54 °C
4. V termocycleru jsme nechali ligovat:
54 °C.....15 min
98 °C.....5 min
20 °C.....∞

5.4.4 PCR

1. Protřepali a centrifugovali jsme SALSA PCR primer
2. Připravili jsme polymerázový mix (2 μ l/vzorek SALSA PCR primer + 7,5 μ l/vzorek Nuclease-free H₂O + 0,5 μ l/vzorek polymeráza = 10 μ l/vzorek) na ledu a pipetou promíchali
3. Přidali jsme 10 μ l polymerázového mixu do každého vzorku a pipetou promíchali
4. Termocycler jsme nastavili na 35 cyklů:

95 °C.....30 s

60 °C.....30 s

72 °C.....60 s

Závěr:

72 °C.....20 min

20 °C..... ∞

V případě potřeby jsme PCR produkty krátkodobě (1 týden) uchovávali v lednici při 4 °C, dlouhodobě jsme je uchovávali v mrazáku při -20 °C.

5.4.5 Fragmentační analýza (ABI 3500 Prism)

1. Do jamek destičky pro fragmentační analýzu jsme vnesli formamid (9 μ l/vzorek) a 500 LIZ size Standard (0,2 μ l/vzorek)
2. Do každé jamky jsme přidali 0,7 μ l PCR produktu
3. Denaturovali jsme při teplotě 86 °C po dobu 3 min, následně zchladili na 4 °C po dobu 2 min, aby došlo k zastavení denaturace
4. Provedli jsme fragmentační analýzu v ABI 3500 Prism

5.4.6 Analýza výsledků

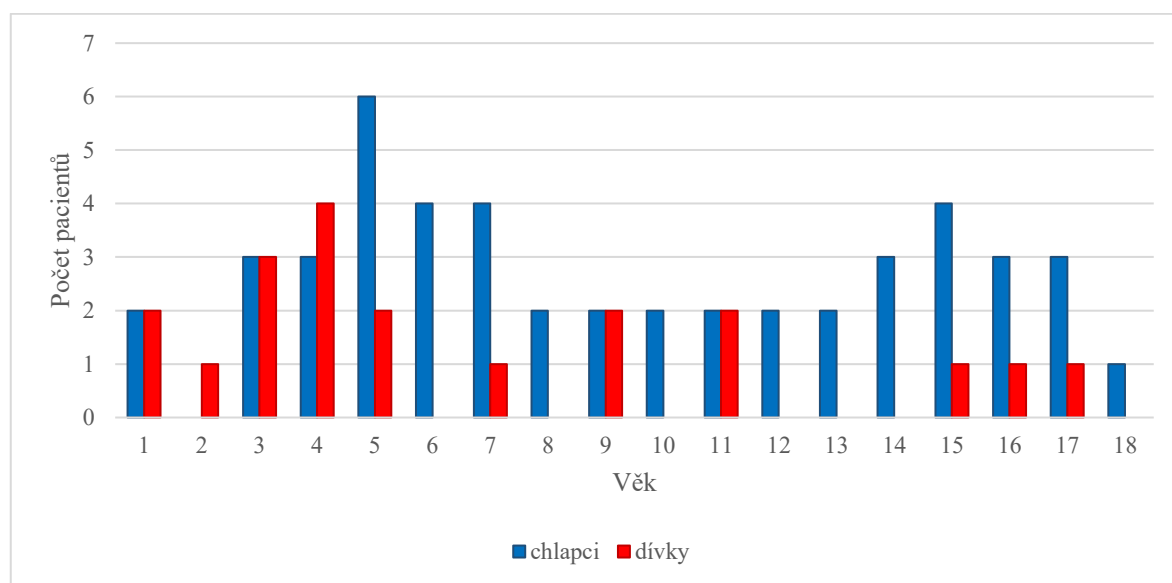
Výsledky jsme hodnotili pomocí speciálního softwaru (Coffalyser). Sledovali jsme relativní velikost jednotlivých píků, které se porovnávají s výškou píků referenční DNA.

5.5 STATISTICKÁ ANALÝZA

K analýze délky přežití do události (EFS) a celkového přežití (OS) jsme provedli Kaplan-Meierovu analýzu. EFS jsme definovali jako délku přežití od stanovení diagnózy do události (relaps/exitus). OS jsme definovali jako přežití od diagnózy do posledního vyšetření.

6 VÝSLEDKY

Vyšetřili jsme buňky kostní dřeně 67 dětí s potvrzenou T-ALL (19 dívek, 48 chlapců, průměrný věk 9,2 let, medián věku 8 let, rozmezí 1–18 let, viz Graf 2). Jednalo se o archivované diagnostické vzorky pacientů léčených na Klinice dětské hematologie a onkologie Fakultní nemocnice v Motole. Všechny pacienty jsme vyšetřili konvenční cytogenetickou analýzou a metodou I-FISH. V případě dostatku materiálu (50 vzorků) jsme izolovali nádorovou DNA pro analýzu metodou MLPA. Výsledky všech vyšetření jsou zahrnuty v Tabulce 12.



Graf 2. Rozložení pacientů podle pohlaví a věku při diagnóze.

6.1 VÝSLEDKY KLASICKÉ CYTOGENETICKÉ ANALÝZY

Pomocí G-pruhování jsme zpracovali vzorky všech 67 pacientů, z čehož jsme úspěšně vyhodnotili 59 vzorků (88 %). U osmi pacientů (12 %) byla konvenční cytogenetická analýza neúspěšná a 20 pacientů (30 %) mělo normální karyotyp. Chromosomové aberace jsme našli u celkem 39 pacientů (58 %). Jednu až dvě aberace jsme našli u 29 nemocných, komplexní karyotyp (tři a více aberací) mělo 10 pacientů. Početní odchylky jsme našli u 12 nemocných (18 %).

6.1.1 Aberace zahrnující *TCR* geny

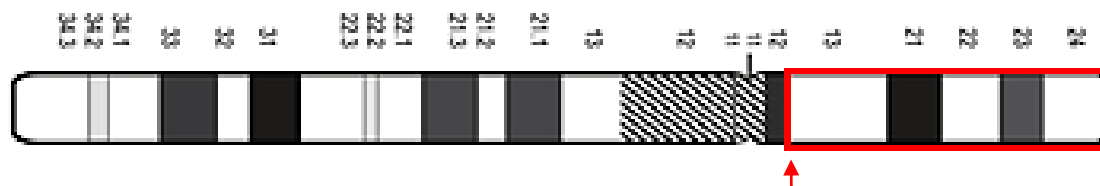
Přestavby genů *TCR* jsme našli celkem u 11 dětí. Lokus *TRA/TRD* v oblasti 14q11.2 byl zasažen v šesti případech, z toho dva pacienti měli translokaci t(11;14)(p13;q11). U pacienta č. 11 (Tabulka 3) se jednalo o nález v rámci komplexního

karyotypu a u nemocného č. 13 o samostatnou změnu. U dvou nemocných jsme detekovali translokaci $t(10;14)(q24;q11)$ a v obou případech byla součástí komplexního karyotypu (pacienti č. 31 a 46, Tabulka 3). Další prokázanou změnou byla translokace $t(8;14)(q24;q11)$ u nemocné č. 3. U pacienta č. 25 jsme našli translokaci $t(1;14)(p32;q11)$ a delecí krátkých ramen chromosomu 5.

Aberace lokusu *TRB* v oblasti 7q34 jsme našli u šesti nemocných. Ve dvou případech se jednalo o aberaci zahrnující chromosomy 1 a 7. V prvním byla v rámci komplexního karyotypu detekována translokace $t(1;7)(p32;q34)$ (pacient č. 11, Tabulka 3), ve druhém případě jsme prokázali inzerci $ins(1;7)(p32;q34q34)$, kdy došlo k inzerci části dlouhých ramen chromosomu 7 do oblasti krátkých ramen chromosomu 1 (pacient č. 43). Dále jsme u pacienta č. 55 našli translokaci $t(7;11)(q34;p13)$ jako samostatnou změnu. U nemocného č. 66 jsme detekovali dva buněčné klony. V prvním jsme prokázali translokaci $t(7;9)(q34;q32)$, ve druhém klonu jsme našli delecí dlouhých ramen chromosomu 6 (viz níže). U dvou nemocných jsme jako součást komplexních přestaveb našli nadpočetnou kopii derivovaného chromosomu 7 (pacienti č. 9 a 59, Tabulka 3) a u jednoho isochromosom pro dlouhá ramena chromosomu 7 (pacient č. 40, tabulka 3). V důsledku této aberace dochází k paciální monosomii 7p a parciální trisomii 7q.

6.1.2 Aberace chromosomu 9

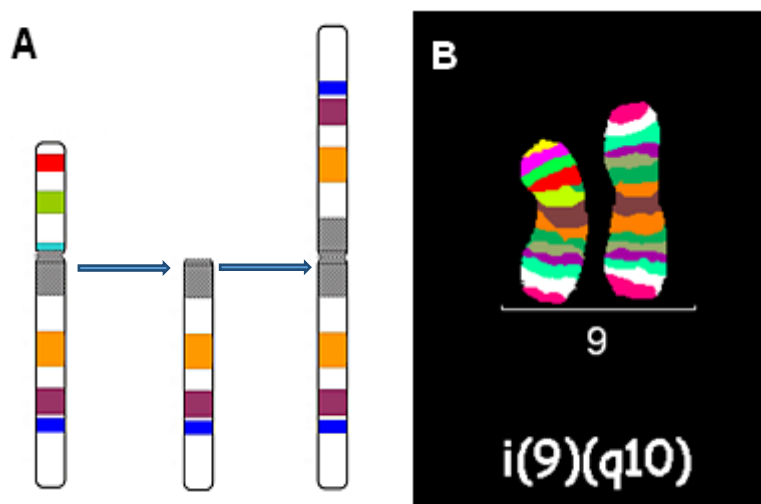
Delece krátkých ramen chromosomu 9 jsme prokázali u pěti nemocných. Tyto aberace byly ve všech případech přítomny v kombinaci s dalšími rekurentními změnami. U dvou pacientů se jednalo o aberace chromosomu 5, a to o translokaci $t(5;14)(q35;q32)$ v rámci komplexních přestaveb (pacient č. 57, Tabulka 3) a delecí oblasti 5q14-q35.3 (pacientka č. 64). Dále byly společně s delecí 9p nalezeny jako součást komplexního karyotypu translokace $t(11;14)(p13;q11)$ u pacienta č. 11 a $t(10;14)(q24;q11)$ u pacienta č. 46 (Tabulka 3). U nemocné č. 67 jsme detekovali rozsáhlou delecí 9p13→9pter (Obrázek 8) a translokaci $t(11;14)(p14;q24.2)$.



Obrázek 8. Schéma chromosomu 9 – červená linie znázorňuje deletovanou oblast a červená šipka místo zlomu při $del(9)(p13pter)$. Převzato a upraveno dle ISCN (2016).

U dvou pacientů jsme našli isochromosom pro dlouhá ramena chromosomu 9 – i(9)(q10) (Obrázek 9). U pacienta č. 35 se jednalo o samostatnou změnu a u pacienta č. 31 byl isochromosom součástí komplexního karyotypu (Tabulka 3). Jedná se o nebalancovanou aberaci, při které vzniká parciální monosomie 9p a parciální trisomie 9q.

Celkem u čtyř dětí došlo k přestavbám chromosomu 9 v rámci komplexních změn (viz níže).



Obrázek 9. A – Schéma vzniku isochromosomu pro dlouhá ramena chromosomu 9. Převzato a upraveno dle ISCN (2016).

B – Isochromosom pro dlouhá ramena chromosomu 9 zobrazený metodou mBAND. Převzato z databáze Centra nádorové cytogenetiky VFN a I.LF UK.

6.1.3 Delece dlouhých ramen chromosomu 6

Mezi rekurentní aberace patří i delece dlouhých ramen chromosomu 6, které jsme prokázali ve čtyřech případech, zlomová místa byla však u každého nálezu odlišná. U pacienta č. 19 se přesné místo zlomu nepodařilo určit. Tato změna byla přítomna společně s delecí dlouhých ramen chromosomu 3. U nemocného č. 54 jsme našli delecí oblasti 6q21-q22 jako samostatnou změnu. U pacienta č. 60 byla přítomna samostatná delece v oblasti 6q12-q14. U pacienta č. 66 jsme detekovali dva buněčné klony, první byl popsán výše, ve druhém jsme detekovali delecí v oblasti 6q16.2-q26 celkem v šesti mitózách.

6.1.4 Komplexní přestavby

Tabulka 3. Karyotypy 10 pacientů s komplexními přestavbami.

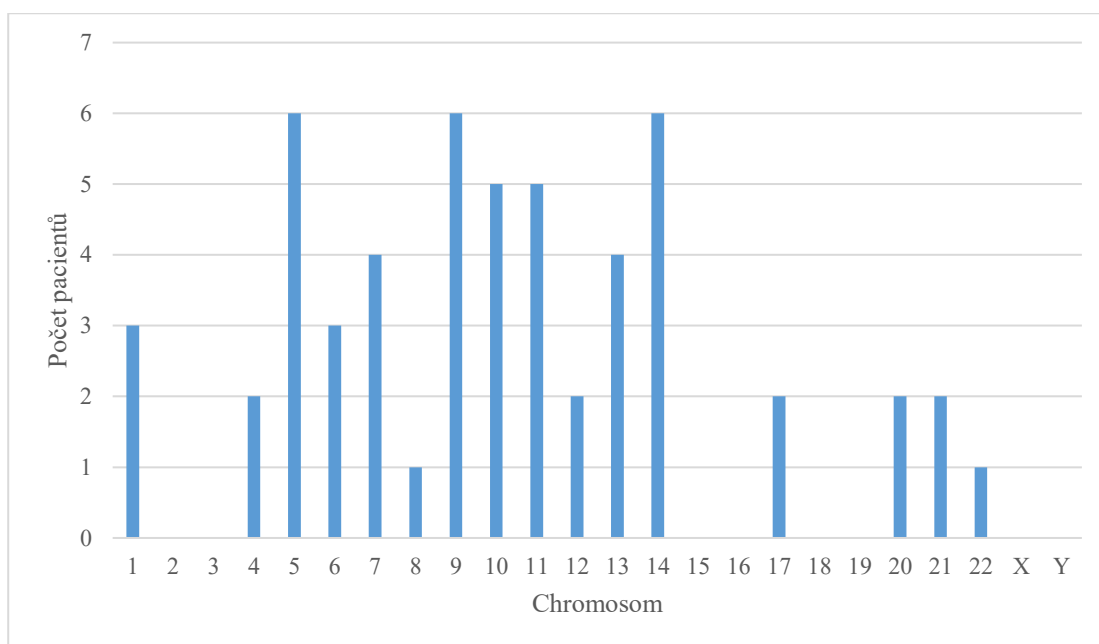
č.p.	Karyotyp
8	46,X,t(X;20)(q24;p11.2),der(5)dup(5)(p?),der(6)ins(6;14)(q21;q?q?),del(11)(q13q22),der(21)t(6;21)(?;q22.2)[22]
9	44~45,XY,del(4)(q28),der(5)t(5;10)(q14;q24),+der(7)t(7;17)(q32;?),t(4;17)(q28;?),-13,der(21)t(13;21)(q22;q21),ins(22;11)(q12;q?q?)[cp19]/46,XY[3]
11	46,XY,t(1;7)(p32;q34),del(9)(p?),t(11;14)(p13;q11)[15]/46,XY[8]
31	47,XY,+8,i(9)(q10),t(10;14)(q24;q11)[19]/46,XY[5]
36	40~45,X-X,t(10;11)(p13;q21),del(12)(p12),del(13)(q22?q33),del(17)(p11.2)[cp22]
40	48,XY,add(1)(p36.1),t(5;14)(q35;q32),i(7)(q10),+9,+13[15]/46,XY[5]
46	46,XY,del(9)(p21p?),t(10;14)(q24;q11)[7]/47,idem,+11[3]/46,XY[26]
52	46,XX,der(1)t(1;19)(p36.3;?),der(4)t(1;4)(q?31;?),del(5)(q?),der(6)t(6;13)(q?25;q?),der(9)t(8;9)(?;p?22),der(11)t(10;11)(?;p15),del(12)(q?),der(16)t(10;16)(?;q?),der(19)t(16;19)(?;?)[cp4]/46,XX [12]
57	46,XY,t(5;14)(q35;q32),der(6)t(1;6)(q41;q2?7),del(9)(p21p21)[5]
59	48,XY,+der(7)t(5;7)(?;q?),+der(7)t(7;?20)(q?;?)[5]/46,XY[4]

č.p.-číslo pacienta

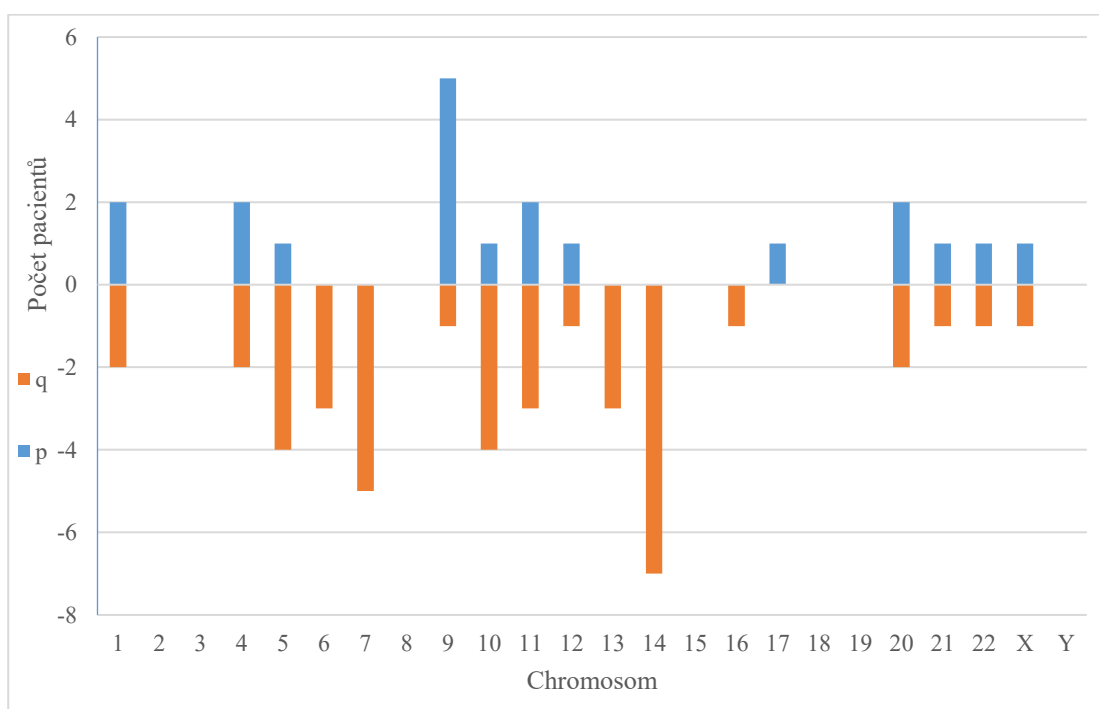
Komplexní chromosomové aberace jsme detekovali celkem u 10 pacientů (17 %). Do komplexních přestaveb nejčastěji vstupovaly chromosomy 5 (6×), 9 (6×), 14 (6×), 10 (5×) a 11 (5×; Graf 3) a ke zlomům častěji docházelo na dlouhých ramenech, jedinou výjimku tvoří chromosom 9, u kterého byla častěji postižena krátká ramena (Graf 4).

Nejčastější rekurentní aberací v rámci komplexních karyotypů byla delecce krátkých ramen chromosomu 9, kterou jsme detekovali u tří pacientů. U pacienta č. 11 se vyskytla společně s translokací t(11;14)(p13;q11), u pacienta č. 46 s t(10;14)(q24;q11) a u pacienta č. 57 s translokací t(5;14)(q35;q32). Isochromosom pro dlouhá ramena chromosomu 9, v jehož důsledku dochází rovněž k delecí celých krátkých ramen chromosomu 9, jsme našli u jednoho nemocného, a to společně s trisomií chromosomu 8 a translokací t(10;14)(q24;q11). U pacienta č. 40 jsme detekovali trisomii chromosomu 9 současně s translokací t(5;14)(q35;q32), i(7)(q10) a dalšími náhodnými změnami. Lze tedy shrnout, že aberace chromosomu 9 se v rámci komplexních přestaveb vždy vyskytovaly současně s dalšími významnými změnami.

U nemocné č. 52 došlo k delecí dlouhých ramen chromosomu 5 a delecí dlouhých ramen chromosomu 12.



Graf 3. Zahrnutí chromosomů do komplexních přestaveb.



Graf 4. Zahrnutí krátkých (p) a dlouhých (q) ramen do komplexních přestaveb.

6.1.5 Numerické aberace

Kromě výše zmíněných tetraploidních klonů jsme našli další dva pacienty s téměř tetraploidním počtem chromosomů (tzv. „near-tetraploidy“). Modální počet chromosomů se u pacienta č. 4 pohyboval mezi 65~82 a byly zde přítomny tetrasomie chromosomů 9, 18, 20, 22, trisomie chromosomu X, monosomie chromosomu 16 a 10~17 marker chromosom. Druhý byl pacient č. 23, který měl 96 chromosomů.

Trisomii chromosomu 8 jsme našli u dvou nemocných. U pacienta č. 31 byla tato aberace přítomna v komplexním karyotypu (Tabulka 3) a u pacienta č. 65 se jednalo o samostatnou změnu.

6.1.6 Další změny

Rekurentní translokaci $t(5;14)(q35;q32)$, která zahrnuje gen *TLX3*, jsme našli celkem u tří pacientů. U nemocných č. 40 a 57 byla tato aberace součástí komplexního karyotypu (Tabulka 3).

Ve dvou případech byly identifikovány delece krátkých ramen chromosomu 12 v oblasti 12p12 až 12pter, které zahrnují gen *ETV6*. U pacienta č. 36 se jednalo o nález v rámci komplexního karyotypu (Tabulka 3).

6.2 VÝSLEDKY I-FISH

Metodou I-FISH s panelem DNA sond pro nejčastější chromosomové aberace u T-ALL jsme vyšetřili všech 67 dětí. Použitý panel lokus-specifické sondy pro geny *CDKN2A* (9p21), *ABL1* (9q34), *TRA/TRD* (14q11.2) a *TRB* (7q34). U 66 pacientů jsme kromě toho provedli analýzu aberací *TRG* (7p14), u 56 pacientů jsme vyšetřili gen *TLX3* (5q35.1) a u 25 dětí gen *TLX1* (10q24.31). Výsledky I-FISH jsou shrnuty v Tabulce 4 a Grafu 5. Chromosomové aberace jsme detekovali celkem u 61 nemocných (91 %).

6.2.1 Gen *CDKN2A*

Nejčastěji jsme našli abnormality v genu *CDKN2A*, a to u 38 pacientů. Bialelickou delecí *CDKN2A* jsme detekovali u 21 nemocných a monoalelickou delecí *CDKN2A* u 14 pacientů. Parciální delece *CDKN2A* jsme detekovali u nemocných č. 58 a 64 a monosomii celého chromosomu 9 u pacienta č. 21.

6.2.2 Geny *TCR*

Dále jsme se zaměřili na geny *TCR*. Změny v lokusu *TRA/TRD* jsme prokázali u 12 pacientů, z toho se v 11 případech jednalo o přestavby *TRA/TRD*. U pacienta č. 47 jsme odhalili ztrátu tohoto lokusu.

Aberace *TRB* jsme identifikovali u 10 pacientů. Ve třech případech byla nalezena nadpočetná kopie *TRB* – u dvou dětí jsme tuto aberaci očekávali vzhledem k přítomnosti nadpočetného derivovaného chromosomu 7 (pacienti č. 9 a 59, Tabulka 3). U šesti dětí jsme našli přestavbu lokusu *TRB*. U tří pacientů se jednalo o translokace mezi chromosomem 7 a chromosomy 1, 9 a 11 – pacient č. 11 měl $t(1;7)(p32;q34)$, č. 55 měl

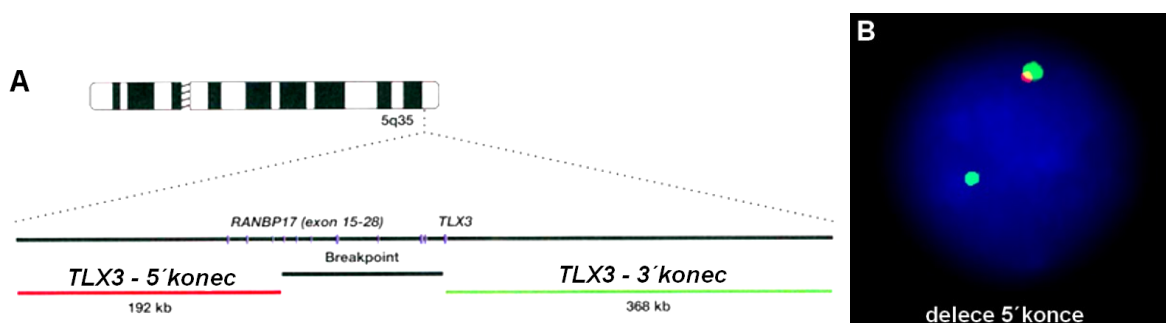
t(7;11)(q34;p13) a č. 66 měl t(7;9)(q34;q32); a u nemocného č. 43 inzerci části dlouhých ramen chromosomu 7 do krátkých ramen chromosomu 1 – ins(1;7)(p32;q34q34). U tří pacientů se jednalo o kryptickou přestavbu, která nebyla detekována konvenčním pruhováním.

Jedinou aberací lokusu *TRG* byl nález nadpočetné kopie u 2/66 dětí v důsledku nadpočetného derivovaného chromosomu 7 (pacienti č. 9 a 59, Tabulka 3).

6.2.3 Geny *TLX1* a *TLX3*

Aberace v genu *TLX1* (10q24.31) jsme našli u 4/25 vyšetřených pacientů. U pacientů č. 31 a 7 (Tabulka 3) jsme potvrdili přestavby tohoto genu v rámci translokace t(10;14)(q24;q11), u nemocného č. 15 nebylo možné přesný karyotyp určit, protože jsme nenalezli žádné hodnotitelné mitosy. U dítěte č. 47 byly přítomny dvě nadpočetné kopie *TLX1*.

Aberace genu *TLX3* (5q35.1) jsme našli u 18 z 56 vyšetřených pacientů. Celkem jsme u 15 dětí detekovali přestavby *TLX3*. Z toho jsme ve třech případech potvrdili, že k této změně došlo v rámci rekurentní translokace t(5;14)(q35;q32) (pacienti č. 40, 56 a 57). Zbýlých 12 pacientů mělo kryptickou přestavbu genu *TLX3*. U nemocné č. 64 došlo k parciální delecí a u pacienta č. 59 (Tabulka 3) jsme detekovali delecí 5' konce genu *TLX3*, ke které mohlo dojít v důsledku nerekiproké translokace mezi chromosomy 5 a 7 nebo kryptické delecí v rámci komplexních přestaveb (Obrázek 10). Dále jsme u nemocného č. 65 detekovali kryptickou delecí 3' konce.



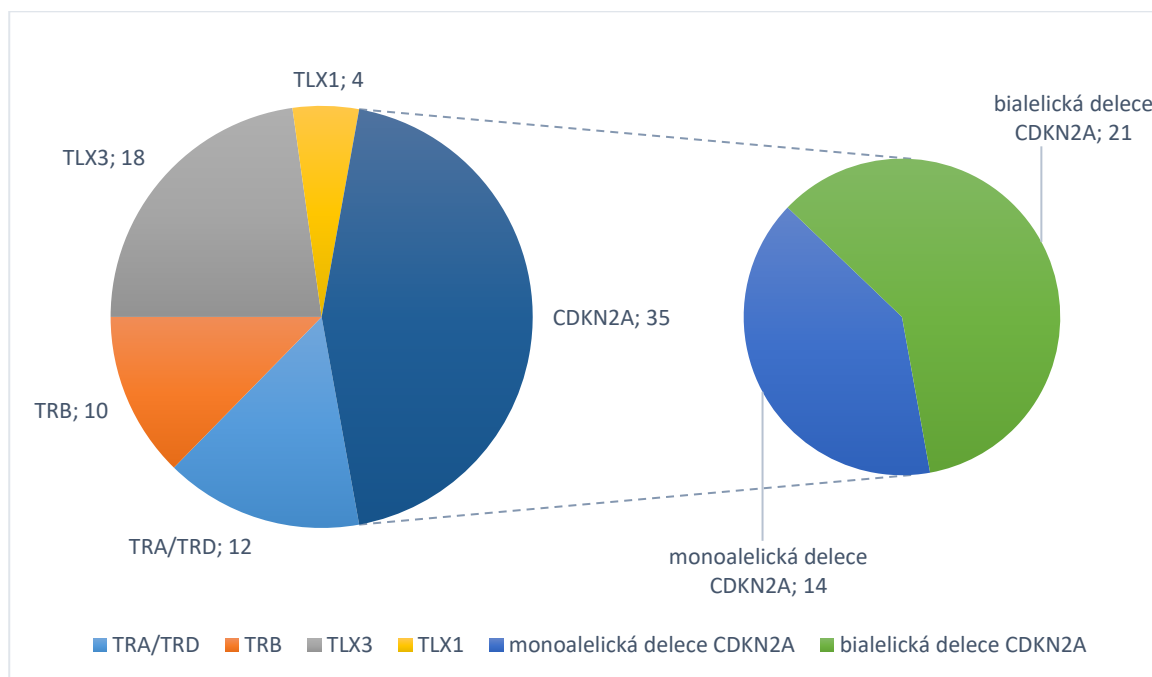
Obrázek 10. A – Schematické znázornění FISH sondy *TLX3* dle DAKO. Červeně fluorescenčně značený 5' konec a zeleně fluorescenčně značený 3' konec genu *TLX3*.

B – Interfázní jádro pacienta č. 59 s prokázanou delecí 5' konce genu *TLX3* detekovanou metodou I-FISH. Převzato z databáze Centra nádorové cytogenetiky VFN a I.LF UK.

6.2.4 Geny *ABL1* a *BCR*

Aberace genu *ABL1* (9q34) jsme detekovali u osmi pacientů. V sedmi případech jsme našli nadpočetnou kopii tohoto genu, která u pacientů č. 31 a 36 vznikla v důsledku isochromosomu pro dlouhá ramena chromosomu 9 (Obrázek 9). U pacientů č. 15 a 16 nebyly nalezeny žádné hodnotitelné mitosy, u nemocného č. 28 se jednalo o nadpočetnou kopii v důsledku trisomie chromosomu 9 a pacienti č. 23 a 49 měli kryptickou aberaci. U nemocného č. 38 jsme našli delecii genu *ABL1*.

Pro detekci těchto abnormalit jsme využívali komerční sondu Vysis LSI *BCR/ABL1* Dual Color od firmy Abbott Molecular, díky čemuž jsme náhodně objevili i aberace genu *BCR* u dvou pacientů. V prvním případě jsme našli amplifikaci *BCR* (pacient č. 2) a v druhém naopak ztrátu, která odpovídala delecii dlouhých ramen chromosomu 22 popsané klasickou cytogenetickou analýzou (pacient č. 51). U pacienta č. 4 s tetrasomií chromosomů 9 a 22 jsme potvrdili nadpočetné kopie genů *BCR* a *ABL1*.



Graf 5. Frekvence chromosomových aberací dle výsledků I-FISH.

Tabulka 4. Srovnání výsledků analýzy karyotypu a I-FISH.

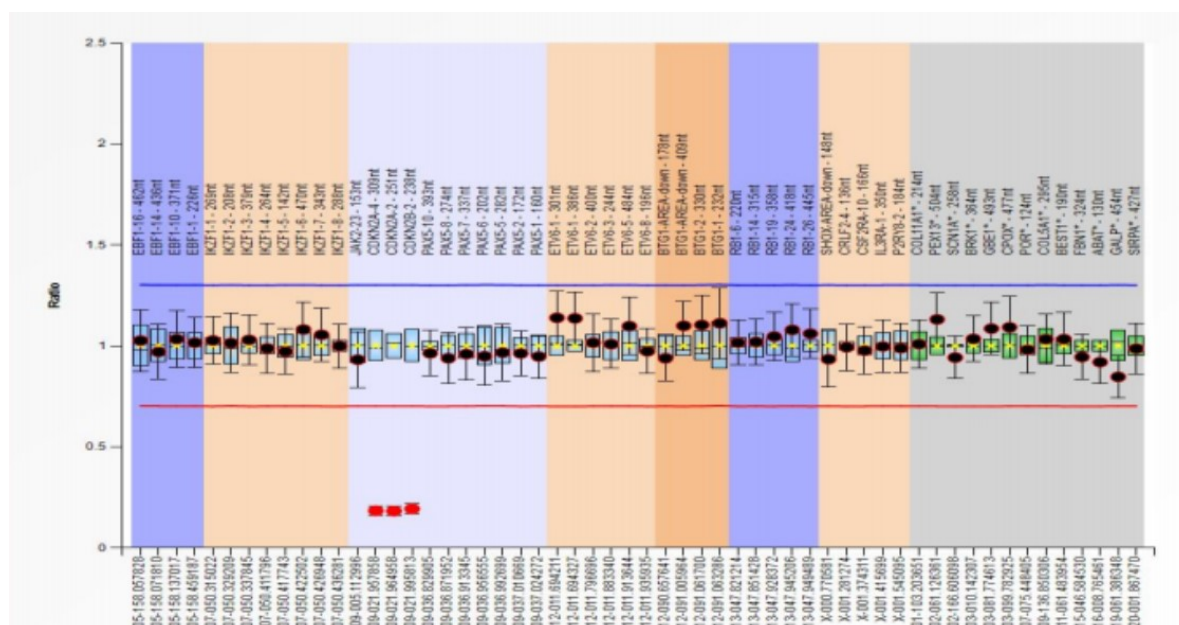
Gen/lokus	Aberace	Analýza karyotypu	%	I-FISH	%
<i>CDKN2A</i> (9p21) 67 vyšetřeno	Bialelická delece	7	10,5	21	31,3
	Monoalelická delece	0	0,0	14	20,9
	Parciální delece	0	0,0	2	3,0
	Monosomie 9	0	0,0	1	1,5
	Celkem	7	10,5	38	56,7
<i>TLX3</i> (5q35.1) 56 vyšetřeno	Přestavba	3	4,5	15	26,7
	Parciální delece	1	1,5	3	5,4
	Celkem	4	6,0	18	32,1
<i>TRA/TRD</i> (14q11.2) 67 vyšetřeno	Přestavba	6	9,0	11	16,4
	Ztráta	0	0,0	1	1,5
	Celkem	6	9,0	12	17,9
<i>TLX1</i> (10q24.31) 25 vyšetřeno	Přestavba	2	3,0	3	12,0
	4 kopie	0	0,0	1	4,0
	Celkem	2	3,0	4	16,0
<i>TRB</i> (7q34) 67 vyšetřeno	Přestavba	4	6,0	6	9,0
	Nadpočetná kopie	2	3,0	3	4,5
	Duplikace 5'konce	0	0,0	1	1,5
	Celkem	6	9,0	10	14,9
<i>ABL1</i> (9q34) 67 vyšetřeno	Nadpočetná kopie	2	3,0	7	10,4
	Ztráta	0	0,0	1	1,5
	Celkem	2	3,0	8	11,9
<i>BCR</i> (22q11) 67 vyšetřeno	Amplifikace	0	0,0	1	1,5
	Ztráta	1	1,5	1	1,5
	Celkem	1	1,5	2	3,0
<i>TRG</i> (7p14) 67 vyšetřeno	Nadpočetná kopie	2	3,0	3	4,5
	Celkem	2	3,0	3	4,5

6.3 VÝSLEDKY MLPA

Pro analýzu metodou MLPA jsme využili komerční kit SALSA MLPA P335 ALL-IKZF1 probemix, který slouží pro vyšetření pacientů s ALL. Tento kit obsahuje sondy pro detekci delecí a amplifikací genů *IKZF1*, *PAX5*, *JAK2*, *ETV6*, *RBI*, *BTG1*, *EBF1*, *CDKN2A-CDKN2B* a oblasti Xp22.33. Pomocí této metody jsme vyšetřili 50 dětí, z čehož jsme odhalili genetické abnormality u 42 pacientů (84 %). Nejčastější výsledky společně s jejich klinickými výstupy jsou shrnuty v Tabulce 5 a Grafu 7.

6.3.1 Delece genů *CDKN2A* a *CDKN2B*

Nejčastější nalezenou změnou byla delece genů *CDKN2A* a *CDKN2B* (9p21.3) u 27 pacientů. Ve čtyřech případech jsme tuto změnu identifikovali pouze metodou MLPA, u ostatních pacientů byl nález v souladu s výsledky I-FISH. Celkem jsme detekovali 19 bialelických (Graf 6) a osm monoalelických delecí těchto genů. Dále jsme u sedmi dětí našli bialelickou deleci, která zahrnovala pouze gen *CDKN2A*. U pacienta č. 12 jsme detekovali monoalelickou deleci exonu *CDKN2A-4* a hraniční deleci exonu *CDKN2A-2* a genu *CDKN2B*. Patientka č. 64 měla prokázanou bialelickou deleci *CDKN2A* a monoalelickou deleci *CDKN2B*.



Graf 6. Výsledky MLPA pacienta č. 39 s bialelickou delecí genů *CDKN2A* a *CDKN2B*. Převzato z databáze Centra nádorové cytogenetiky VFN a I.LF UK.

6.3.2 Aberace genu *JAK2*

U čtyř nemocných jsme našli delecí genu *JAK2* (9p24.1) současně s bialelickou delecí *CDKN2A* a *CDKN2B*, z toho pouze u jedné nemocné byla delece *JAK2* detekována rovněž klasickou cytogenetickou analýzou, která potvrdila rozsáhlou ztrátu oblasti 9p13→9pter (pacientka č. 67). U ostatních pacientů se jednalo o kryptické změny.

6.3.3 Aberace genu *PAX5*

Kryptickou delecí genu *PAX5* (9p13.2) jsme odhalili u čtyř pacientů a u všech byly tyto změny nalezeny současně s bialelickou delecí *CDKN2A* a *CDKN2B*. U pacientů č. 31 a 35 byla navíc detekována delece *JAK2*.

6.3.4 Aberace genu *ETV6*

Dalšími častými změnami byly aberace genu *ETV6* (12p13.2) u pěti pacientů, z toho se ve třech případech jednalo o delece. U dvou nemocných byla klasickou cytogenetickou analýzou zároveň detekována terminální delece krátkých ramen chromosomu 12 se zlomem v oblasti 12p12 (pacienti č. 36 a 48). U nemocné č. 36 byla delece *ETV6* nalezena v kombinaci s monoalelickou delecí *CDKN2A* a *CDKN2B*. Nemocný č. 48 měl bialelickou delecí *CDKN2A* a *CDKN2B*. U pacienta č. 38 byla tato aberace nalezena jako kryptická společně s amplifikací genu *BTG1*. Kromě delecí jsme u dvou dětí prokázali amplifikace genu *ETV6*. U pacientky č. 1 byla detekována v kombinaci s amplifikací *BGT1*. U nemocného č. 29 jsme ji našli společně s amplifikací *BTG1*, *EBF1* a bialelickou delecí *CDKN2A* a *CDKN2B*. Všechny změny v kombinaci s amplifikací *ETV6* jsme určili jako kryptické.

6.3.5 Aberace genu *BTG1*

Aberace genu *BTG1* (12q21.33) jsme potvrdili u čtyř pacientů. Nálezy u pacientů č. 29 a 38 jsou popsány výše. U nemocné č. 52 jsme v rámci komplexního karyotypu našli bialelickou delecí *CDKN2A*, delecí genů *CDKN2B*, *COL11A1*, exonů *JAK2-23*, *BTG1-2* a hraniční delecí exonů *BTG-AREA-down* a *BTG1-1*. U této pacientky byla klasickou cytogenetickou analýzou nalezena delece dlouhých ramen chromosomu 12, přičemž se nepodařilo určit přesné místo zlomu. Můžeme proto předpokládat, že se jednalo o částečnou ztrátu genu *BTG1* v oblasti 12q21 v důsledku této přestavby, nebo že se jednalo o kryptickou aberaci. U pacientky č. 53 jsme detekovali kryptickou delecí genů *RBI* a *BTG1*.

6.3.6 Aberace genu *RBI*

Další zkoumanou oblastí byl gen *RBI* (13q14.2). Aberace tohoto genu jsme našli u tří nemocných. U pacienta č. 46 jsme našli hraniční bialelickou delecí exonů *RBI-19*, *RBI-24*, *RBI-26* společně s bialelickou delecí *CDKN2A* a *CDKN2B*. U pacientky č. 53 jsme detekovali delecí genů *RBI* a *BTGI* (viz výše). U nemocného č. 66 jsme našli amplifikaci *RBI* a kryptickou delecí *CDKN2A*. Všechny výše zmíněné aberace genů *RBI* a *BTGI* byly kryptické.

6.3.7 Aberace genu *IKZF1*

Sondou pro gen *IKZF1* (7p12.2) jsme odhalili aberaci u pacienta č. 9, a to amplifikaci genu *IKZF1* v důsledku nadpočetného derivovaného chromosomu, dále měl kryptickou delecí exonu *CDKN2A-4* a kryptické amplifikace exonu *ETV6-1* a genu *BTGI*. Pacient č. 59 měl v důsledku nadpočetného derivovaného chromosomu 7 amplifikaci 7p s kryptickou delecí 4-7 exonu *IKZF1* současně s bialelickou delecí genů *CDKN2A* a *CDKN2B*.

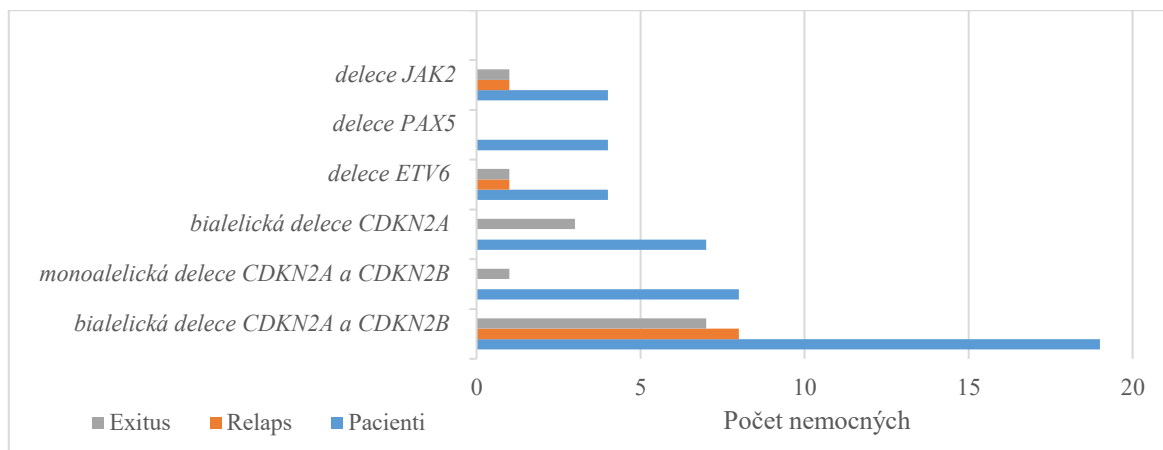
6.3.8 Aberace genu *EBF1*

Gen *EBF1* (5q33.3) byl v našem souboru detekován jako aberantní ve dvou případech. Jednalo se o pacientku č. 64, u které jsme detekovali delecí tohoto genu v důsledku delece oblasti 5q14-35.5. U této nemocné byla navíc nalezena delece genu *CDKN2A-4* a bialelická delece *CDKN2A-2* a *CDKN2B*, což potvrdilo výsledky klasické cytogenetické analýzy (delece oblasti 9p21p21) i I-FISH (parciální delece *CDKN2A*, viz výše). U pacienta č. 29 jsme našli amplifikaci exonu *EBF1-1*. Tato kryptická změna je popsána výše.

Tabulka 5. Nejčastější abnormality dle výsledků MLPA.

Nalezená změna	Pacienti	%	Relaps	%	Exitus	%
Bialelická delece <i>CDKN2A</i> a <i>CDKN2B</i>	19	27,9	8	42,1	7	36,8
Monoalelická delece <i>CDKN2A</i> a <i>CDKN2B</i>	8	11,8	0	0,0	1	12,5
Bialelická delece <i>CDKN2A</i>	7	10,3	0	0,0	3	42,9
Delece <i>ETV6</i>	4	5,9	1	25,0	1	25,0
Delece <i>PAX5</i>	4	5,9	0	0,0	0	0,0
Delece <i>JAK2</i>	4	5,9	1	25,0	1	25,0

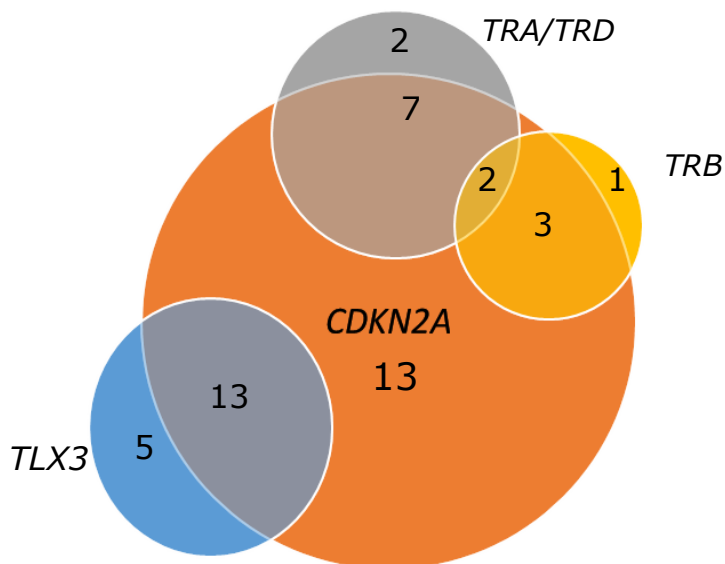
Procentuální zastoupení relapsů a exitů je vypočítáno z počtu pacientů ve druhém sloupci.



Graf 7. Nejčastější abnormality dle analýzy MLPA s klinickými výstupy.

6.4 KOMBINACE CHROMOSOMOVÝCH ABERACÍ

Dalším hodnoceným faktorem byl výskyt kombinací jednotlivých aberací. V Tabulce 6 je shrnuta distribuce jednotlivých chromosomových aberací včetně událostí u všech pacientů. Nejčastější kombinace jsou znázorněny v Grafu 8. Nejčastěji se jednalo o kombinaci aberací genu *CDKN2A* s aberacemi *TLX3*, a to ve 13 případech. Další častou kombinací byly změny genů *CDKN2A* a *TRA/TRD* u sedmi nemocných. Zatímco kombinovaný výskyt abnormalit těchto genů byl relativně častý, aberace genu *TLX3* se nikdy nevyskytovaly současně s *TRA/TRD*. Odchytky u genu *TLX1* byly vždy přítomny v kombinaci s dalšími změnami, ve třech případech s aberacemi v lokusu *TRA/TRD* a v lokusu *TRB*. Další kombinace jsme vyhodnotili jako náhodné.



Graf 8. Kombinace nejčastějších změn dle výsledků I-FISH – aberace *CDKN2A*, *TLX3* a přestavby *TRA/TRD* a *TRB*.

Tabulka 6. Distribuce chromosomových aberací u jednotlivých pacientů.

Číslo pacienta	TRA/TRD	TRB	TRG	CDKN2A	ABL1	BCR	TLX3	TLX1	ETV6	JAK2	PAX5	BTG1	RB1	IKZF1	EBF1	Událost	Číslo pacienta	TRA/TRD	TRB	TRG	CDKN2A	ABL1	BCR	TLX3	TLX1	ETV6	JAK2	PAX5	BTG1	RB1	IKZF1	EBF1	Událost	
1																	35																	
2																	36																	
3																	37																	
4																	38																	
5																	39																	
6																	40																	
7																	41																	
8																	42																	
9																	43																	
10																	44																	
11																	45																	
12																	46																	
13																	47																	
14																	48																	
15																	49																	
16																	50																	
17																	51																	
18																	52																	
19																	53																	
20																	54																	
21																	55																	
22																	56																	
23																	57																	
24																	58																	
25																	59																	
26																	60																	
27																	61																	
28																	62																	
29																	63																	
30																	64																	
31																	65																	
32																	66																	
33																	67																	
34																																		

Zelená = delece/ztráta, červená = zisk/nadpočetná kopie, oranžová = strukturní přestavba

6.5 SOUČASNÝ KLINICKÝ STAV PACIENTŮ

K datu 17. 2. 2018 žilo 47 dětí (70 %) v první nebo druhé kompletní remisi. K relapsu došlo u 14 pacientů (21 %). Celkem 20 pacientů (30 %) zemřelo, z toho pět během indukční léčby, 12 v důsledku relapsu a tři v důsledku sekundární malignity. Medián délky sledování všech pacientů je 4,4 let a medián délky sledování pouze žijících pacientů je 8,5 let. Klinické údaje pacientů jsou zahrnuty v Tabulce 11.

Během indukční léčby zemřeli dva pacienti s bialelickou delecí *CDKN2A*, z toho se u nemocného č. 30 jednalo o samostatnou změnu a u nemocného č. 29 byla v kombinaci s přestavbou *TLX3* a amplifikací *EBF1-1*, *ETV6-1*, *BTG1-1*. Pacientka č. 8 měla monoalelickou delecí *CDKN2A* v rámci komplexního karyotypu, u nemocného č. 23 jsme našli nadpočetnou kopii genu *ABL1* a tetraploidii a pacient č. 37 měl karyotyp s translokací t(9;11)(p22;q23) (nespecifická aberace).

V důsledku relapsu zemřelo pět nemocných s bialelickou delecí genů *CDKN2A* a *CDKN2B*, z toho u pacientů č. 40 a 44 byla tato delecce nalezena v kombinaci s přestavbou *TLX3*, u pacienta č. 2 byla v kombinaci s přestavbou *TLX3* a amplifikací *BCR*, u nemocného č. 59 byla v kombinaci s delecí 5' konce genu *TLX3*, nadpočetnou kopií *TRB* a *TRG* a amplifikací 7p s delecí 4-7 exonu *IKZF1* a u nemocné š. 67 byla v kombinaci s delecí *JAK2*. Dále v důsledku relapsu zemřeli pacienti č. 19 a 20 se samostatnou přestavbou *TLX3*, pacient č. 5 s monoalelickou delecí *CDKN2A*, nemocná č. 36 s monoalelickou delecí *CDKN2A*, *CDKN2B* a *ETV6*, nemocný č. 47 s kombinací ztráty *TRA/TRD* a tetrasomií *TLX1*, pacientka č. 45 s bialelickou delecí exonu *CDKN2A-4* a pacient č. 18 s normálním nálezem.

U čtyř pacientů se vyskytla sekundární malignita: u pacientů č. 9 a 39 sAML (sekundární akutní myeloidní leukemie), nemocný č. 9 zemřel; u nemocné č. 16 glioblastom a u pacientky č. 52 sMDS (sekundární myelodysplastický syndrom), oba zemřeli.

V druhé kompletní remisi (CR2) žijí celkem tři nemocní, z toho pacient č. 39 měl bialelickou delecí *CDKN2A* a *CDKN2B*, u pacienta č. 60 jsme našli bialelickou delecí *CDKN2A* a nemocná č. 64 měla delecí oblasti 5q33.3, monoalelickou delecí *CDKN2A-4* a *Xp22PAR* a bialelickou delecí *CDKN2A-2* a *CDKN2B*.

6.6 ANALÝZA PŘEŽITÍ (EFS A OS)

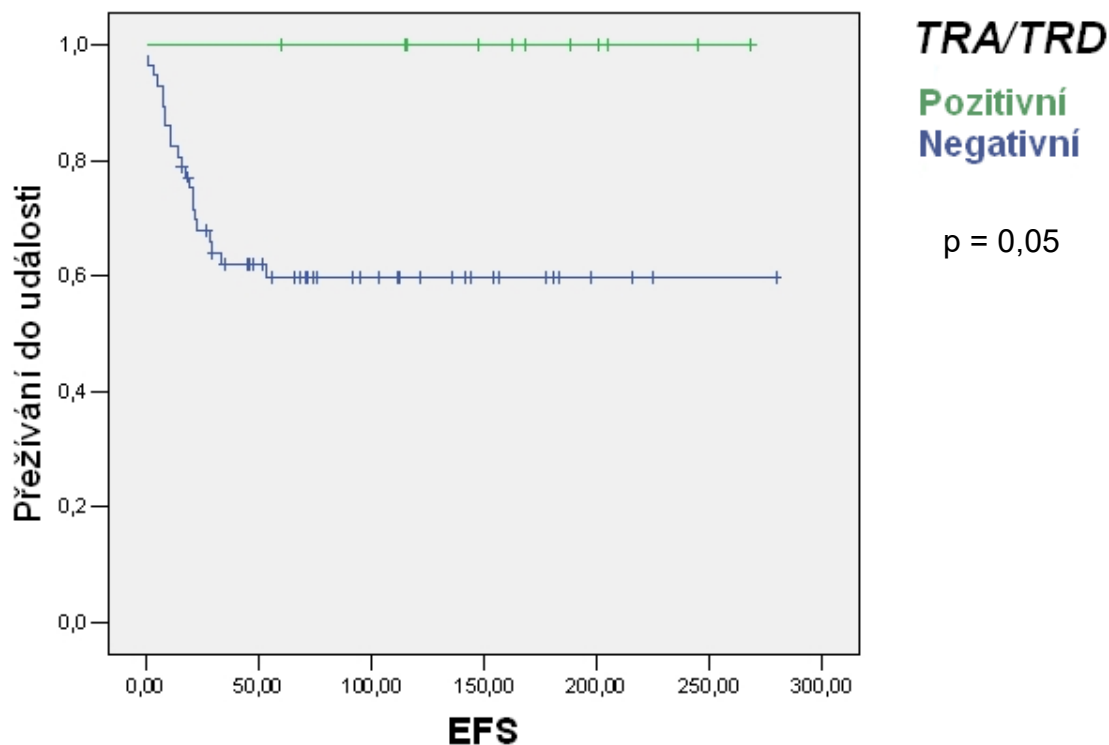
Provedli jsme statistickou analýzu pro klasickou cytogenetickou analýzu, nejčastější chromosomové aberace a pohlaví pacientů. K nejčastějším aberacím jsme zařadili přestavby *TRA/TRD*, aberace *CDKN2A* a přestavby *TLX3*. Hodnotili jsme přežívání do události (EFS) a celkové přežití (OS) na hladině významnosti 0,05. Přežívání OS i EFS se v daných kategoriích u pěti parametrů statisticky významně lišilo pouze pro parametr *TRA/TRD* ($p = 0,05$, Graf 9, Graf 10) a to především proto, že při pozitivním *TRA/TRD* nikdo nezemřel a ani nedošlo k relapsu. U parametru *TLX3* se statisticky významně lišilo jen OS ($p = 0,05$, Graf 12), přestože Graf 11 naznačuje jistou spojitost

TLX3 i s EFS (Graf 11), která ale nebyla statisticky významná. U zbývajících parametrů se statisticky významný rozdíl na zvolené hladině významnosti 0,05 v přežívání podle kategorií nepodařilo prokázat.

Přežívání do EFS nemocných s aberacemi *TRA/TRD*

Tabulka 7. Přežívání do EFS nemocných s aberacemi *TRA/TRD*.

<i>TRA/TRD</i>	n	n událostí	Žije	
			n	Procenta
0 -negativní	56	22	35	61,4 %
1 -pozitivní	11	0	11	100,0 %
Celkem	67	22	46	67,6 %

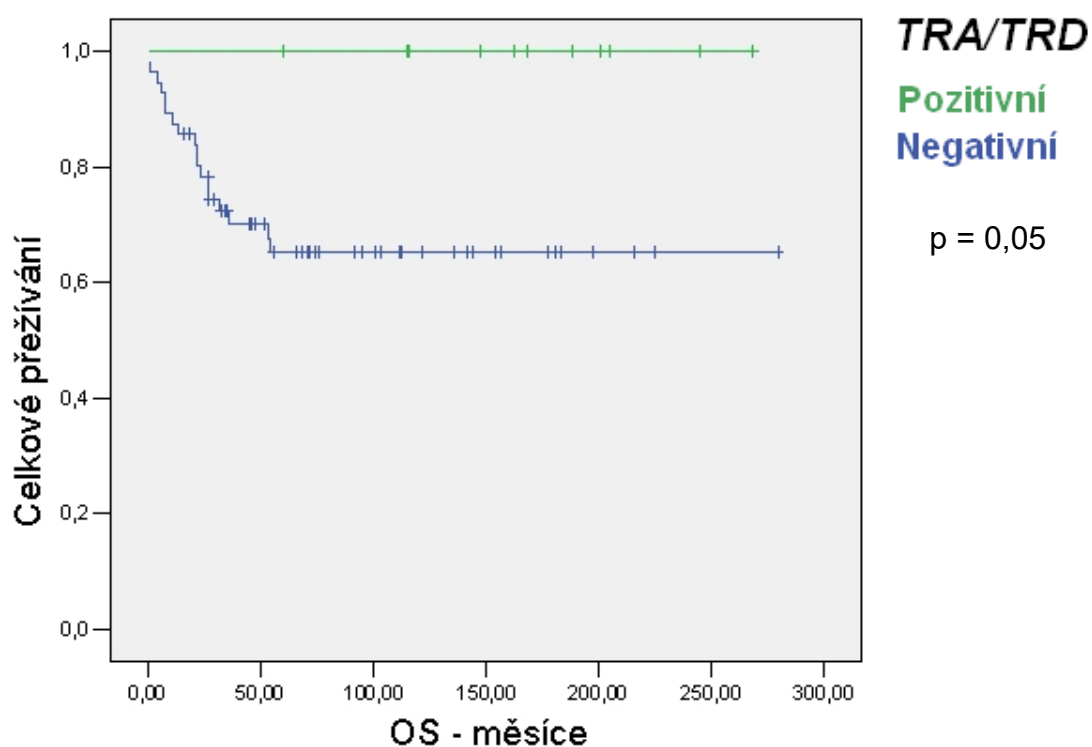


Graf 9. Přežívání do EFS nemocných s aberacemi *TRA/TRD*.

Celkové přežití (OS) nemocných s aberacemi *TRA/TRD*

Tabulka 8. Celkové přežití (OS) nemocných s aberacemi *TRA/TRD*.

<i>TRA/TRD</i>	n	n událostí	Žije	
			n	Procenta
0 -negativní	56	18	38	67,9 %
1 -pozitivní	11	0	11	100,0 %
Celkem	67	18	49	73,1 %

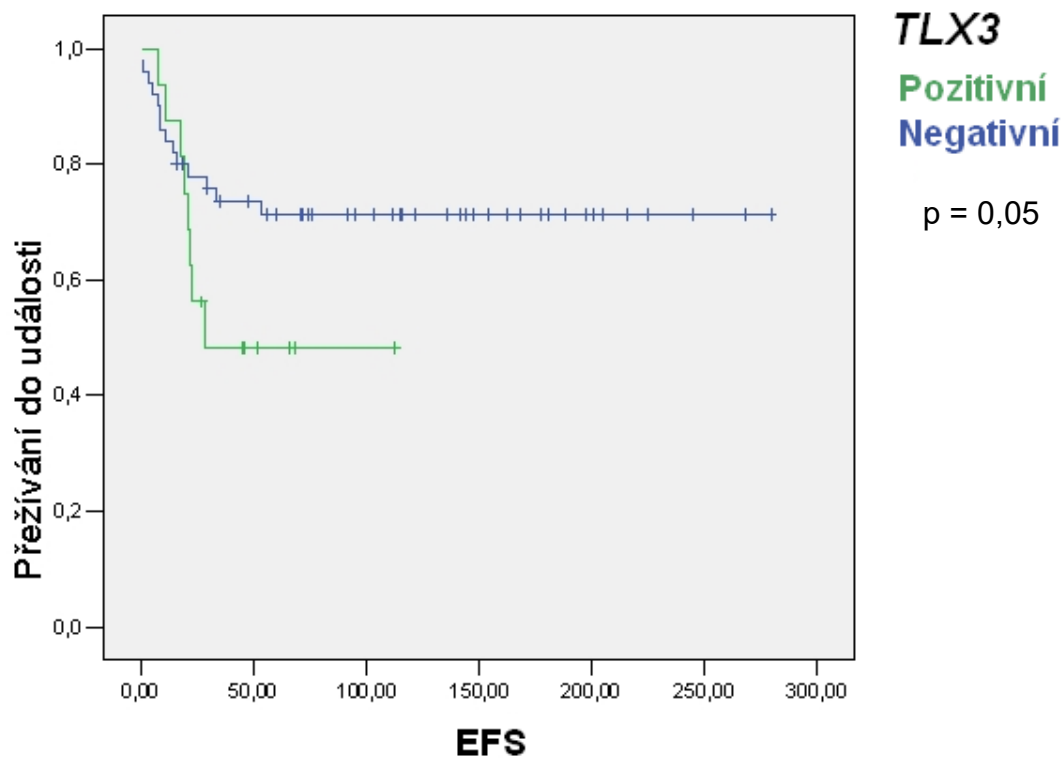


Graf 10. Celkové přežití (OS) nemocných s aberacemi *TRA/TRD*.

Přežívání do EFS nemocných s aberacemi *TLX3*

Tabulka 9. Přežívání do EFS nemocných s aberacemi *TLX3*.

<i>TLX3</i>	n	n událostí	Žije	
			n	Procenta
0 -negativní	50	14	36	72,0 %
1 -pozitivní	16	8	8	50,0 %
Celkem	66	22	44	66,7 %

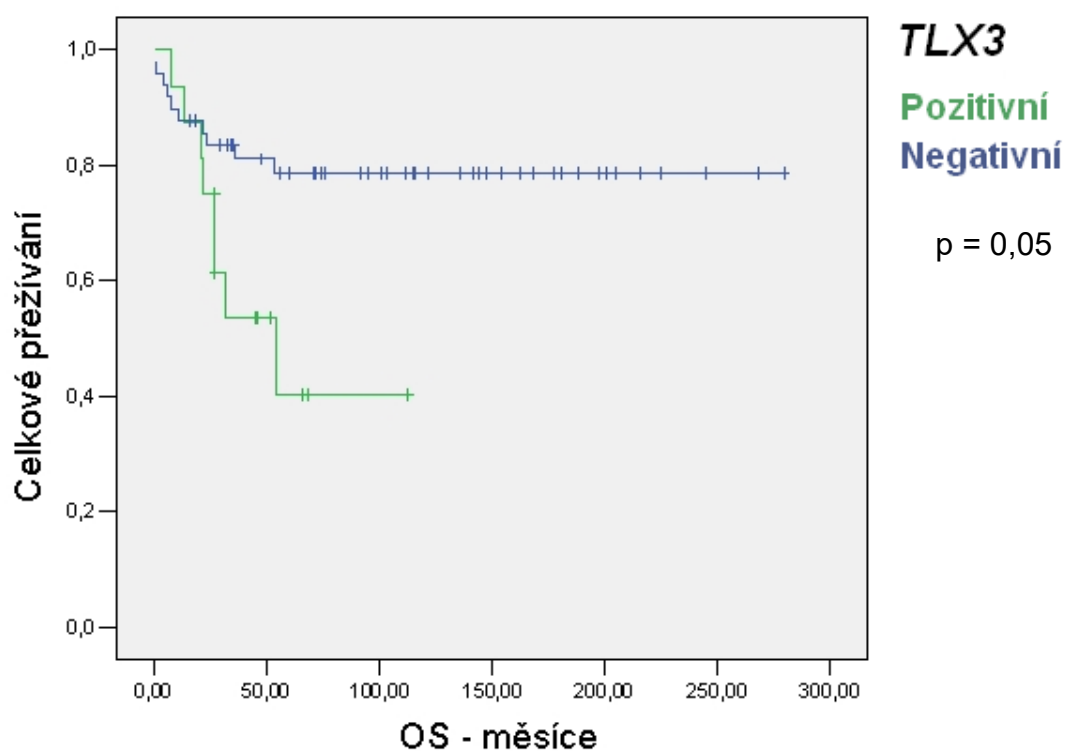


Graf 11. Přežívání do EFS nemocných s aberacemi *TLX3*.

Celkové přežití (OS) nemocných s aberacemi TLX3

Tabulka 10. Celkové přežití (OS) nemocných s aberacemi TLX3.

TLX3	n	n událostí	Žije	
			n	Procenta
0 -negativní	49	10	39	79,6 %
1 -pozitivní	16	8	8	50,0 %
Celkem	65	18	47	72,3 %



Graf 12. Celkové přežití (OS) nemocných s aberacemi TLX3.

7 DISKUZE

Jedním z nejdůležitějších nezávislých prognostických faktorů u pacientů s hematologickými malignitami jsou chromosomové aberace. Řada z nich je specifická pro určitý subtyp onemocnění a u většiny z nich byl určen jejich přesný prognostický význam. U dětských B-ALL bylo popsáno mnoho rekurentních chromosomových aberací včetně jejich předpokládaného vlivu na další vývoj onemocnění. Včasný záchyt těchto odchylek je důležitý pro zařazení pacientů do prognostických skupin a volbu odpovídající léčebné strategie. Ačkoli bylo v minulosti identifikováno několik chromosomových abnormalit v souvislosti s méně četným subtypem T-ALL, jejich přesný prognostický význam není v současné době zcela znám. Jeho určení a hledání nových nenáhodných genetických změn může přispět k lepšímu poznání počátku a rozvoje onemocnění, a tím i k volbě lepší a účinnější terapie.

Strukturní a numerické aberace můžeme detekovat cytogenomickými metodami. Klasická cytogenetická analýza karyotypu buněk kostní dřeně založená na využití pruhovacích technik představuje zlatý standard při detekci chromosomových aberací v leukemických buňkách, má však určitá významná omezení. K těm nejdůležitějším patří např. nízký mitotický index (nedostatek buněk ve stádiu metafáze), omezená proliferativní aktivita leukemických buněk *in vitro* a často horší kvalita hodnocených chromosomů (Ritterbach et al., 1998). Další limitaci představují abnormality pod rozlišovací schopností této metody (tzv. kryptické aberace). Karyotyp takových buněk se jeví jako normální, přestože u nich došlo ke kryptickým přestavbám. Právě tyto změny jsou typické pro T-ALL, proto jsou pro detekci známých rekurentních chromosomových aberací u tohoto leukemického subtypu nenahraditelné cytogenomické a molekulárně genetické metody.

V rámci této retrospektivní studie byl vyšetřen unikátní soubor 67 dětí s diagnózou T-ALL. Vzorky nemocných byly shromažďovány po dobu 20 let a medián sledování žijících pacientů je 8,5 let. Archivované vzorky kostní dřeně těchto pacientů jsme podrobili klasickému cytogenetickému vyšetření a analýze pomocí I-FISH se specifickým panelem DNA sond pro detekci nejčastějších a prognosticky nejvýznamnějších aberací u T-ALL. Tento panel byl navržen v Centru nádorové cytogenetiky ÚLBD, VFN a 1. LF na základě nejčastějších nálezů z předešlých let a výsledků publikovaných v odborné literatuře. Cílem tohoto vyšetření bylo určit frekvenci výskytu kryptických rekurentních změn a posoudit jejich význam pro prognózu onemocnění. U 50 dětí byl v archivu Centra nádorové

cytogenetiky dostatek materiálu pro vyšetření metodou MLPA. Použili jsme komerční kit pro detekci změn u pacientů s ALL. Cílem této analýzy bylo detekovat případné nové nenáhodné aberace a upřesnit výsledky konvenční cytogenetické analýzy a I-FISH.

O komplexních karyotypech u T-ALL je v literatuře velmi málo údajů. Studie dle Motlló et al. (2014) uvádí nálezy u dospělých pacientů s ALL, kde bylo 117 případů s T-ALL a 11 z nich (9,5 %) mělo komplexní karyotyp (Motlló et al., 2014). V našem souboru jsme komplexní karyotypy prokázali u 10 dětí (15 %). Konvenční cytogenetickou analýzou jsme v komplexních karyotypech opakovaně nejčastěji detekovali delece krátkých ramen chromosomu 9, a to celkem u čtyř pacientů (přičemž v jednom případě došlo k deleci 9p v důsledku vzniku isochromosomu pro dlouhá ramena chromosomu 9). Následná molekulární analýza odhalila, že 9/10 nemocných mělo deleci genů *CDKN2A* a *CDKN2B* a pacient měl deleci exonu *CDKN2-A-4*. Dále jsme u čtyř pacientů s komplexními karyotypy našli aberace genu *TLX3*. V našem souboru žijí v první kompletní remisi (CR1) pouze 4/10 pacientů s komplexními karyotypy. U AML se komplexní karyotyp vyskytuje u 10–12 % případů a je spojován se špatnou prognózou (Mrózek et al., 2019). Ve studii dle Waheed et al. (2018) byl komplexní karyotyp přítomen u 4 % pacientů s ALL a všichni nemocní zemřeli během indukční léčby (Waheed et al., 2018).

Dle literatury lze klasickou cytogenetickou analýzou detekovat chromosomové aberace v 55–75 % případů dětské T-ALL a můžeme je rozdělit do dvou hlavních kategorií – delece a translokace (Graux et al., 2006; Zachariadis et al., 2011). V této studii jsme chromosomové abnormality našli u 39 z celkového počtu 67 dětí (58 %), což odpovídá datům publikovaným v literatuře. Molekulárně-cytogenetické metody zvyšují šanci na detekci chromosomových abnormalit u T-ALL. V naší studii jsme pomocí I-FISH našli změny u 61 pacientů, čímž jsme zvýšili záchyt chromosomových aberací na 91 %. Metoda MLPA přispěla k detekci delecí a amplifikací jednotlivých genů u 42 pacientů (84 %).

V případech, kdy se naše výsledky pohybují na spodní hranici výskytu jednotlivých aberací, se jedná o tzv. chybu malých čísel. Přestože se jedná o unikátní soubor nemocných s T-ALL v České republice, v porovnání s velkými zahraničními a mezinárodními studiemi je náš soubor stále relativně malý. Jeden nález dané aberace v našem případě představuje větší procentuální zastoupení než u porovnávané literatury.

Nejčastější odchylkou u dětí s T-ALL jsou delece genu *CDKN2A* v oblasti 9p21, které se dle literatury vyskytují až v 50–70 % případů (Ferrando et al., 2002; Hagemeijer and Graux, 2010). Delece krátkých ramen chromosomu 9 jsou dle literatury detekovány klasickou cytogenetickou analýzou v 15 % případů (Schneider et al., 2000; Karrman et al.,

2009). Celkem byly konvenční cytogenetickou analýzou detekovány změny krátkých ramen chromosomu 9 u šesti pacientů (9 %). Deleci této oblasti jsme našli u čtyř pacientů (6 %). Velmi zajímavý nálezem v našem souboru je isochromosom pro dlouhá ramena chromosomu 9, který jsme pozorovali u dvou dětí. Tato rekurentní aberace byla dosud popisována hlavně v souvislosti s B-ALL, kde je však její výskyt velmi nízký (Rohil et al., 2019). Důsledkem této aberace je ztráta krátkých ramen chromosomu 9 (parciální monosomie 9p), což má srovnatelný efekt jako delece 9p. V důsledku této aberace dochází ke ztrátě řady TSG včetně *CDKN2A* a *CDKN2B* (Ferrando et al., 2002; Hagemeijer and Graux, 2010; Girardi et al., 2017; Karrman and Johansson, 2017). A také k parciální trisomii 9q, která má naopak za následek amplifikaci některých onkogenů (např. *ABL1*, *NOTCH1*) (Hagemeijer and Graux, 2010; National Library of Medicine, 2015). Tyto změny mají prokazatelný vliv na rozvoj nádorových onemocnění.

Metodou I-FISH jsme ztrátu genu *CDKN2A* našli celkem u 38 nemocných (57 %), což je v souladu s výsledky publikovanými v literatuře. Oproti výsledkům klasické cytogenetické analýzy se tak počet pacientů s delecí 9p zvýšil o 48 %. Navíc jsme prokázali další kryptické změny (u dvou nemocných jsme detekovali parciální deleci genu *CDKN2A* a u jednoho dítěte jsme našli monosomii chromosomu 9).

Nejčastěji detekovanou aberací pomocí metody MLPA byla delece genů *CDKN2A* a *CDKN2B*. Dle literatury dochází k delecí genu *CDKN2B* s mírně nižší frekvencí, než u *CDKN2A* (Girardi et al., 2017). Delece těchto genů jsme detekovali u 27 z 50 pacientů (54 %). V sedmi dalších případech jednalo pouze o ztrátu *CDKN2A*, což znamená, že celkem jsme delecí tohoto genu detekovali u 68 % nemocných. Samostatnou delecí *CDKN2B* jsme prokázali pouze v jednom případě, celkem jsme ji našli u 56 % nemocných, což je ve shodě s dosud publikovanými daty. V některých případech se nám díky vyšší citlivosti metody podařilo identifikovat změny, které nebylo možné detekovat metodou I-FISH. U čtyř dětí jsme detekovali ztráty navzdory normálnímu nálezu I-FISH. Například u jednoho nemocného jsme našli delecí exonu *CDKN2A-4* a hraniční delecí *CDKN2A-2* a *CDKN2B*.

Rekurentní translokace u T-ALL nejčastěji zahrnují geny *TCR*. Pomocí FISH je možné tyto aberace detekovat až ve 30 % případů. Nicméně se odhaduje, že klasickou cytogenetickou analýzou lze tyto změny nalézt pouze u asi poloviny případů (Le Noir et al., 2012). V našem souboru jsme aberace *TCR* genů detekovali celkem u 21 nemocných (31 %). Jako kryptické jsme tyto aberace vyhodnotili u 11 pacientů. To znamená, že

v polovině případů jsme nebyli schopni detekovat tyto odchylky klasickou cytogenetickou analýzou, což potvrzuje údaje uváděné v literatuře.

U 5–10 % pacientů se dle Bilhou-Nabera (2011) vyskytují $t(11;14)(p13;q11)$ a $t(7;11)(q34;p13)$, kdy je gen *LMO2* přesunut z oblasti 11p13 do oblasti lokusu *TRA/TRD* nebo *TRB* (Bilhou-Nabera, 2011). Tyto translokace jsme našli u tří dětí (4,5 %), a to dvakrát $t(11;14)(p13;q11)$ a jednou $t(7;11)(q34;p13)$.

Podle údajů v literatuře patří k dalším rekurentním translokacím $t(10;14)(q24;q11)$ a $t(7;10)(q34;q24)$, které jsou popisovány u 4–8 % dětí a během kterých dochází k přemístění genu *TLX1* do blízkosti *TRA/TRD* nebo *TRB* (Girardi et al., 2017; Gindina and Beel, 2018). V našem souboru jsme translokaci $t(10;14)(q24;q11)$ našli u dvou pacientů a $t(7;10)(q34;q24)$ nebyla detekována u žádného dítěte. Celkem jsme tedy prokázali translokace genů *TLX1* ve 3 % případů.

Translokace *TCR* zahrnující gen *TAL1* se dle literatury vyskytují asi u 3 % pacientů. Častěji se jedná o $t(1;14)(p32;q11)$, zatímco $t(1;7)(p32;q34)$ je vzácnější (Huret, 2001; Hagemeijer and Graux, 2010). V našem souboru jsme prokázali $t(1;14)(p32;q11)$ u jednoho pacienta (1,5 %) a rovněž u jednoho pacienta (1,5 %) vzácnou translokaci $t(1;7)(p32;q34)$. Kromě toho jsme u jednoho pacienta (1,5 %) pozorovali inzerci $ins(1;7)(p32;q34q34)$ se stejnými zlomovými místy jako u $t(1;7)(p32;q34)$. Celkem jsme tedy prokázali strukturní přestavby zahrnující oblasti 1p32 a 7q34 u 4,5 % pacientů.

Dle Boyer (2011) se ve 2 % případů vyskytuje $t(8;14)(q24;q11)$, kdy je onkogen *MYC* přesunut z oblasti 8q24 do blízkosti enhancerů *TRA/TRD*, což nadměrně stimuluje syntézu normálního produktu genu *MYC*. Dle literatury je tato translokace analogická k $t(2;8)(p12;q24)$ a $t(8;22)(q24;q11)$, které se vyskytují u Burkittova lymfomu. Předpokládá se, že zvýšení množství produktu *MYC* je dostačující pro iniciaci nádorového růstu (Boyer, 2001). Translokaci $t(8;14)(q24;q11)$ jsme detekovali u jednoho pacienta (1,5 %).

Abnormality zahrnující lokus *TRA/TRD* jsme v této studii pomocí I-FISH detekovali celkem u 12 pacientů (18 %), přestavby genu *TRB* jsme pozorovali u 10 nemocných (15 %), a přestavby genu *TRG* jsme zachytili u tří dětí (4,5 %). Nejčastěji jsme nacházeli přestavby jednotlivých lokusů, v polovině případů v důsledku výše popsaných translokací. V jednom případě jsme detekovali ztrátu *TRA/TRD*, která je popisována pouze v souvislosti s V(D)J rekombinací, její význam v nádorových buňkách je zatím neznámý.

U dvou nemocných jsme detekovali nadpočetné kopie genů *TRB* a *TRG* v důsledku nadpočetného derivovaného chromosomu 7 a u jednoho pacienta jsme našli

isochromosom pro dlouhá ramena chromosomu 7. Nebalancované aberace chromosomu 7 jsou v literatuře popisovány u pacientů s HSTL (hepatosplenický T-buněčný lymfom). Charakteristickou aberací tohoto onemocnění je isochromosom pro dlouhá ramena chromosomu 7, v jehož důsledku dochází k parciální monosomii 7p, tedy ke ztrátě kandidátních TSG (např. *MEOX2* a *SOSTDC2*), a parciální trisomii 7q, a tím k nadměrné aktivaci některých onkogenů (např. *PTPN12*, *RUNDC3B*, *PPP1R9A* a *ABCB1*) (Travert et al., 2012). Gen *PTPN12* pochází ze stejné genové rodiny jako *PTPN2*. V souvislosti s T-ALL byly u *PTPN2* popsány delecce u pacientů s přestavbami genů *TLX1* (Kleppe et al., 2010). Ve studii Ferreiro et al. (2014) dochází k amplifikaci lokusů *TRB* a *TRG* v důsledku tvorby ring chromosomu 7 (Ferreiro et al., 2014). HSTL je stejně jako T-ALL agresivní forma nádoru vznikajícího z T-buněk, navíc také častěji postihuje muže a má špatnou prognózu (Ferreiro et al., 2014). Potvrzení, zda v důsledku nebalancovaných aberací chromosomu 7 dochází k podobným mechanismům iniciace nádorové transformace jako u HSTL, je úkolem dalších molekulárních analýz.

Přestavby genu *TLX3* se dle Bernard et al. (2001) objevuje u 20–25 % případů dětských T-ALL (Bernard et al., 2001). Tyto změny jsou často kryptické (Berger, 2011) a jsou proto obtížně detekovatelné konvenčními pruhovacími technikami. V našem souboru jsme pomocí analýzy karyotypu našli translokace t(5;14)(q35;q32) u tří nemocných (4,5 %), nicméně přesné údaje ohledně četnosti této translokace v literatuře nejsou známy. Metodou I-FISH jsme přestavby *TLX3* detekovali u 15/56 pacientů (27 %), výsledek I-FISH analýzy se shoduje s literaturou. Dle Van Vlierberghe et al. (2008a) existuje několik delecí spojených s přestavbou *TLX3*. Mimo jiné popsali delecce oblasti 5q35, kterou našli ve 25 % případů (Van Vlierberghe et al., 2008a). V naší studii jsme prokázali parciální delecce tohoto genu ve 3/18 případů (tj. cca 17 % z námi nalezených aberací genu *TLX3*).

Aberace genu *TLX1* se podle literárních údajů vyskytují asi v 8 % případů (Girardi et al., 2017). My jsme tuto aberaci našli u 4/25 pacientů (16 %). Stejně jako u přestaveb *TLX3* není znám podíl translokací detekovatelných klasickou cytogenetickou analýzou a kryptických přestaveb. V naší studii jsme zaznamenali vyšší záchyt této aberace metodou I-FISH, což je ale pravděpodobně dáno spíše tzv. chybou malých čísel. Ve studii dle De Keersmaecker et al. (2010) zkoumali vliv exprese *TLX1* na rozvoj T-ALL na myších modelech. Mimo jiné zjistili, že u leukemií vyvolaných nadměrnou expresí *TLX1* se často vyskytují i numerické odchylky. Vyslovili hypotézu, že aberace tohoto genu může ovlivňovat funkci mitotického aparátu (De Keersmaecker et al., 2010). V našem souboru

jsme u všech pacientů s hodnotitelnými mitózami (tři ze čtyř) detekovali také trisomie chromosomů 8, 11 a 19 a v jednom případě jsme našli dvě nadpočetné kopie *TLX1*.

Delece dlouhých ramen chromosomu 6 jsou podle literatury popisovány u 20 % nemocných s T-ALL (Schneider et al., 2000; Karrman et al., 2009). V našem souboru jsme tuto delecii našli u čtyř pacientů (6 %), místa zlomů byla u každého odlišná. Ve studii dle Gachet et al. (2018) byly identifikovány dva chybějící geny *SYNCRIP* a *SNHG5* v oblasti 6q14, které mohou být potencionálními TSG (Gachet et al., 2018). U jednoho dítěte jsme prokázali ztrátu oblasti 6q12-q14, můžeme tedy předpokládat, že došlo i ke ztrátě výše zmíněných genů.

Další známou, i když vzácnou, rekurentní aberací je fúzní gen *NUP214-ABL1*, který je popisován u asi 5 % případů. Tento fúzní gen je obvykle přítomen v podobě tzv. „double minutes“ (DM), kdy dochází k jeho episomální amplifikaci. Pro detekci této aberace jsme využívali komerčně značenou sondu pro fúzní gen *BCR/ABL1*. Při použití této sondy by se pozitivní nález projevoval jako amplifikovaný extrachromozomální signál pro gen *ABL1*. Takový nález jsme však nepozorovali u žádného pacienta. Nicméně u sedmi dětí jsme pomocí této sondy detekovali nadpočetnou kopii genu *ABL1*. Dle Hagemeijer a Graux (2010) dochází k zisku kopií genu *ABL1* zřídka (Hagemeijer and Graux, 2010), my jsme ho však prokázali u 10 % nemocných, z toho v 7 % jako kryptickou aberaci. U jednoho pacienta jsme našli i ztrátu tohoto genu. Ve studii dle Kim et al. (2010) popisovali 5 případů B-ALL, kdy došlo k delecii genu *ABL1* bez přítomnosti fúzního *BCR/ABL1*, u dětí s T-ALL však tento nález dosud popsán nebyl. Díky použité sondě *BCR/ABL1* se nám u dvou dětí podařilo odhalit i aberace genu *BCR*. V prvním případě došlo k delecii, ve druhém k amplifikaci tohoto genu. Prognostický význam těchto změn však není známý.

Kromě frekvence výskytu jednotlivých aberací jsme studovali i jejich vzájemné kombinace. Nejčastěji jsme v kombinaci s ostatními změnami nacházeli aberace genu *CDKN2A*. V 15 případech se tato změna vyskytovala v rámci vyšetřovaného panelu genů samostatně, ve 13 případech jsme ji našli společně s aberacemi *TLX3* a v sedmi případech s aberacemi *TRA/TRD*. Zatímco kombinace těchto genů byly v našem souboru relativně časté, aberace genu *TLX3* se nikdy nevyskytovaly současně s aberacemi *TRA/TRD* a přestavbami *TRB*. Dále jsme identifikovali, že aberace genu *TLX1* byly přítomny vždy společně s přestavbami *TRA/TRD* nebo *TRB*. Tento nález je ve shodě s literárními údaji, že přestavby *TLX1* se vyskytují výhradně v kombinaci s přestavbami lokusů *TCR* (Girardi et al., 2017).

Pro nejčastěji zastoupené aberace detekované metodou I-FISH byla provedena statistická analýza PFS a OS na hladině významnosti 0,05. Údaje v literatuře ohledně prognostického významu delecí *CDKN2A* se liší. Dle Mirji et al. (2016) jsou tyto změny spojovány se špatnou prognózou (Mirji et al., 2016), naopak dle Van Vlierberghe et al. (2013) jsou spjaty s dobrou prognózou (Van Vlierberghe et al., 2013). V našem souboru se u aberací *CDKN2A* statisticky významný rozdíl nepodařilo prokázat v žádné kategorii. Aberantní exprese *TLX3* je asociována s horší prognózou a vyšším rizikem vzniku relapsu (Ballerini et al., 2002; Ferrando et al., 2002; Baak et al., 2008). V naší studii se statisticky významně lišilo jen OS, pacienti s aberacemi v genu *TLX3* měli horší celkové přežití a vyšší riziko vzniku relapsu. Přítomnost abnormální exprese genu *TLX1* je dle literatury spojována s lepší prognózou a se sníženým rizikem relapsu (Ferrando et al., 2002, 2004). Pro tento parametr jsme statistickou analýzu neprováděli z důvodu nízkého počtu pacientů, nicméně všichni tři pacienti s přestavbou *TLX1* žijí v současnosti v CR1.

Díky sekvenačním metodám a mikročipovým analýzám byly popsány oblasti devátého chromosomu, kde dochází k rekurentním kryptickým aberacím. Příkladem je monoalelická delece genu *PAX5* v oblasti 9p13 u 28 % dětských B-ALL, která je přítomná jako kryptická aberace i jako součást větších delecí 9p (Mullighan et al., 2007). Ve studii dle Dang et al. (2015) byla zkoumána role genu *PAX5* v leukemogenezi na myších modelech a autoři potvrdili hypotézu, že se jedná o TSG. Analýzou genomu poté prokázali zvýšený výskyt mutací v dalších genech, např. z genové rodiny *JAK*. Tento nález byl však asociován pouze s B-ALL (Dang et al., 2015). V další studii se autoři zaměřili na epigenetické modifikace genu *PAX5* u T-ALL (Hütter et al., 2011). Porovnávali metylaci promotoru *PAX5* u skupiny zdravých jedinců a pacientů s T-ALL. V kontrolní skupině nebyla oblast promotoru metylována, zatímco u nemocných docházelo až k 85 % metylaci. Následná analýza exprese tohoto genu naznačuje umlčení promotoru *PAX5*, což může mít vliv na patogenezi onemocnění (Hütter et al., 2011). Deleci genu *PAX5* jsme našli u 4 pacientů (8 %) vždy společně s bialelickou delecí genů *CDKN2A* a *CDKN2B*.

Gen *ETV6* kontroluje produkci proteinu, který funguje jako transkripční faktor a hraje důležitou roli v zárodečném vývoji a regulaci tvorby krevních buněk. Vyskytuje se ve všech buňkách těla, kde tlumí aktivitu určitých genů a v leukemogenezi zastává funkci TSG (National Library of Medicine, 2013). Delece/inaktivace genu *ETV6* se dle literatury vyskytují zhruba u 8 % dětských T-ALL (Girardi et al., 2017). V této studii jsme ji detekovali u tří pacientů (6 %), z toho dva měli deleci krátkých ramen chromosomu 12. V některých studiích bylo na základě analýzy pacientů s B-ALL a MDS navrženo, že

v určitých případech může *ETV6* fungovat jako onkogen a amplifikace *ETV6* může být jedním z dalších mechanismů leukemogeneze (Mauvieux et al., 2004; Chae et al., 2010). V našem souboru jsme našli amplifikaci *ETV6* u dvou pacientů.

Gen *RBI* je typickým zástupcem TSG a u dětí s T-ALL jeho delece jsou přítomny v 6-10 % případů (Mansur et al., 2015). V našem souboru jsme tuto změnu našli u dvou dětí (4 %).

8 ZÁVĚR

Provedli jsme podrobnou retrospektivní a prospektivní cytogenomickou analýzu buněk kostní dřeně u 67 dětí s T-ALL. Klasickou cytogenetickou analýzou se nám podařilo odhalit chromosomové aberace u 39 pacientů (58 %). Pomocí metod I-FISH a MLPA jsme detekovali chromosomové aberace u 61 pacientů, čímž jsme zvýšili jejich záchyt na 91 %.

Nejčastěji jsme našli aberace v genech *CDKN2A* (kryptické ve 41/48 případech), *TLX3* (kryptické ve 14/18 případech), *TRA/TRD* (kryptické v 6/12 případech) a *TRB* (kryptické v 6/10 případech). Pomocí metody MLPA jsme odhalili další kryptické genetické abnormality, z toho se nejčastěji jednalo geny *ETV6* (5×) a *PAX5* (4×), *JAK2* (4×) a *BTG1* (4×).

Prokázali jsme, že v tomto souboru pacientů aberace genů *TRA/TRD* statisticky významně ovlivňují celkové přežití a přežití do události. Aberace genu *TLX3* se statisticky významně lišily jen v celkovém přežití. Nález přestaveb genů *TRA/TRD* byl spojen s dobrou prognózou onemocnění a všichni pacienti žijí v první kompletní remisi. Naopak pacienti s aberacemi *TLX3* měli horší celkové přežití a vyšší riziko vzniku relapsu.

Díky rozvoji cytogenomických metod se významně zvýšil záchyt kryptických chromosomových aberací, které mohou mít vliv na patogenezi onemocnění. Vhodně zvolená kombinace klasických a molekulárně cytogenetických technik poskytuje komplexní informaci o genomu leukemických buněk a přispívá tak ke zpřesnění diagnostiky a zlepšení léčby dětských ALL.

9 POUŽITÁ LITERATURA

- Aaltonen L, Peltomäki P, Leach F, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin J, Jarvinen H, Powell S, Jen J, Hamilton SR, Petersen G, Kinzler K, Vogelstein B, de la Chapelle A. 1993. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* (80-) 260:812–816.
- Aaltonen LA, Peltomäki P, Mecklin JP, Järvinen H, Jass JR, Green JS, Lynch HT, Watson P, Tallqvist G, Juhola M. 1994. Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Res* 54:1645–1648.
- Alitalo K, Schwab M, Lin CC, Varmus HE, Bishop JM. 1983. Homogeneously staining chromosomal regions contain amplified copies of an abundantly expressed cellular oncogene (c-myc) in malignant neuroendocrine cells from a human colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:1707–1711.
- Baak U, Gökbuget N, Orawa H, Schwartz S, Hoelzer D, Thiel E, Burmeister T, German Multicenter ALL Study Group. 2008. Thymic adult T-cell acute lymphoblastic leukemia stratified in standard- and high-risk group by aberrant HOX11L2 expression: experience of the German multicenter ALL study group. *Leukemia* 22:1154–1160.
- Ballerini P, Blaise A, Busson-Le Coniat M, Su XY, Zucman-Rossi J, Adam M, Van Den Akker J, Perot C, Pellegrino B, Landman-Parker J, Douay L, Berger R, Bernard OA. 2002. HOX11L2 expression defines a clinical subtype of pediatric T-ALL associated with poor prognosis. *Blood* 100:991–997.
- Ballerini P, Busson M, Fasola S, van den Akker J, Lapillonne H, Romana SP, Marynen P, Bernard OA, Landman-Parker J, Berger R. 2005. NUP214-ABL1 amplification in t(5;14)/HOX11L2-positive ALL present with several forms and may have a prognostic significance. *Leukemia* 19:468–470.
- Baretti M, Le DT. 2018. DNA mismatch repair in cancer. *Pharmacol Ther* 189:45–62.
- van den Berg E, Stevens-Kroef M. 2017. t(8;14)(q24;q32) / t(2;8)(p12;q24) / t(8;22)(q24;q11). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* 21:56–59.
- Bernard OA, Busson-LeConiat M, Ballerini P, Mauchauffé M, Della Valle V, Monni R, Nguyen Khac F, Mercher T, Penard-Lacronique V, Pasturaud P, Gressin L, Heilig R, Daniel MT, Lessard M, Berger R. 2001. A new recurrent and specific cryptic translocation, t(5;14)(q35;q32), is associated with expression of the Hox11L2 gene in T acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 15:1495–1504.

- Bestor TH. 2000. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 9:2395–2402.
- Bilhou-Nabera C. 2011. t(11;14)(p13;q11) - t(7;11)(q35;p13). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* 3:22–23.
- Boyer J. 2001. t(8;14)(q24;q11). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* 5:190–191.
- Březinová J. 2000. Delece chromozómů u hematologických malignit. Disertační práce.
- Bridge JA. 2008. Advantages and limitations of cytogenetic, molecular cytogenetic, and molecular diagnostic testing in mesenchymal neoplasms. *J Orthop Sci* 13:273–282.
- Capocasale RJ, Lamb RJ, Vonderheid EC, Fox FE, Rook AH, Nowell PC, Moore JS. 1995. Reduced surface expression of transforming growth factor beta receptor type II in mitogen-activated T cells from Sézary patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:5501–5505.
- Cauwelier B, Dastugue N, Cools J, Poppe B, Herens C, De Paepe A, Hagemeijer A, Speleman F. 2006. Molecular cytogenetic study of 126 unselected T-ALL cases reveals high incidence of TCRβ locus rearrangements and putative new T-cell oncogenes. *Leukemia* 20:1238–1244.
- Cave H, Suciú S, Preudhomme C, Poppe B, Robert A, Uyttebroeck A, Malet M, Boutard P, Benoit Y, Mauvieux L, Lutz P, Méchinaud F, Grardel N, Mazingue F, Dupont M, Margueritte G, Pages M-P, Bertrand Y, Plouvier E, Brunie G, Bastard C, Plantaz D, Vande Velde I, Hagemeijer A, Speleman F, Lessard M, Otten J, Vilmer E, Dastugue N. 2004. Clinical significance of HOX11L2 expression linked to t(5;14)(q35;q32), of HOX11 expression, and of SIL-TAL fusion in childhood T-cell malignancies: results of EORTC studies 58881 and 58951. *Blood* 103:442–450.
- Cayuela JM, Gardie B, Sigaux F. 1997. Disruption of the multiple tumor suppressor gene MTS1/p16(INK4a)/CDKN2 by illegitimate V(D)J recombinase activity in T-cell acute lymphoblastic leukemias. *Blood* 90:3720–3726.
- Chae H, Kim M, Lim J, Kim Y, Han K, Lee S. 2010. B lymphoblastic leukemia with ETV6 amplification. *Cancer Genet Cytogenet* 203:284–287.
- Chauveinc L, Mosseri V, Quintana E, Desjardins L, Schlienger P, Doz F, Dutrillaux B. 2001. Osteosarcoma following retinoblastoma: age at onset and latency period. *Ophthalmic Genet* 22:77–88.
- Chudoba I, Plesch A, Lörch T, Lemke J, Claussen U, Senger G. 1999. High resolution multicolor-banding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 84:156–160.

- Clappier E, Cuccuini W, Kalota A, Crinquette A, Cayuela J-M, Dik WA, Langerak AW, Montpellier B, Nadel B, Walrafen P, Delattre O, Aurias A, Leblanc T, Dombret H, Gewirtz AM, Baruchel A, Sigaux F, Soulier J. 2007. The C-MYB locus is involved in chromosomal translocation and genomic duplications in human T-cell acute leukemia (T-ALL), the translocation defining a new T-ALL subtype in very young children. *Blood* 110:1251–1261.
- Clappier E, Gerby B, Sigaux F, Delord M, Touzri F, Hernandez L, Ballerini P, Baruchel A, Pflumio F, Soulier J. 2011. Clonal selection in xenografted human T cell acute lymphoblastic leukemia recapitulates gain of malignancy at relapse. *J Exp Med* 208:653–661.
- Dang J, Wei L, De Ridder J, Su X, Rust AG, Roberts KG, Payne-Turner D, Cheng J, Ma J, Qu C, Wu G, Song G, Huether RG, Schulman B, Janke L, Zhang J, Downing JR, Van Der Weyden L, Adams DJ, Mullighan CG. 2015. PAX5 is a tumor suppressor in mouse mutagenesis models of acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 125:3609–3617.
- Degos L. 2001. John Hughes Bennett, Rudolph Virchow... and Alfred Donné: the first description of leukemia. *Hematol J Off J Eur Haematol Assoc* 2:1.
- Dürbaum M, Storchová Z. 2016. Effects of aneuploidy on gene expression: Implications for cancer. *FEBS J* 283:791–802.
- Eden T. 2010. Aetiology of childhood leukaemia. *Cancer Treat Rev* 36:286–297.
- Egerton M, Scollay R, Shortman K. 1990. Kinetics of mature T-cell development in the thymus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:2579–2582.
- Einsiedel HG, von Stackelberg A, Hartmann R, Fengler R, Schrappe M, Janka-Schaub G, Mann G, Hählen K, Göbel U, Klingebiel T, Ludwig W-D, Henze G. 2005. Long-term outcome in children with relapsed ALL by risk-stratified salvage therapy: results of trial acute lymphoblastic leukemia-relapse study of the Berlin-Frankfurt-Münster Group 87. *J Clin Oncol* 23:7942–7950.
- Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD, Sklar J. 1991. TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* Notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* 66:649–661.
- Fernández L, Lapunzina P, Arjona D, López Pajares I, García-Guereta L, Elorza D, Burgueros M, De Torres M, Mori M, Palomares M, García-Alix A, Delicado A. 2005. Comparative study of three diagnostic approaches (FISH, STRs and MLPA) in 30 patients with 22q11.2 deletion syndrome. *Clin Genet* 68:373–378.
- Ferrando AA, Neuberg DS, Dodge RK, Paietta E, Larson RA, Wiernik PH, Rowe JM,

- Caligiuri MA, Bloomfield CD, Look AT. 2004. Prognostic importance of TLX1 (HOX11) oncogene expression in adults with T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* (London, England) 363:535–536.
- Ferrando AA, Neuberg DS, Staunton J, Loh ML, Huard C, Raimondi SC, Behm FG, Pui CH, Downing JR, Gilliland DG, Lander ES, Golub TR, Look AT. 2002. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 1:75–87.
- Ferreiro JF, Rouhigharabaei L, Urbankova H, Van Der Krogt JA, Michaux L, Shetty S, Krenacs L, Tousseyn T, De Paepe P, Uyttebroeck A, Verhoef G, Taghon T, Vandenberghe P, Cools J, Wlodarska I. 2014. Integrative genomic and transcriptomic analysis identified candidate genes implicated in the pathogenesis of hepatosplenic T-cell lymphoma. *PLoS One* 9:e102977.
- Fishel R, Lescoe MK, Rao MRS, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R. 1993. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 75:1027–1038.
- Futreal PA, Coin L, Marshall M, Down T, Hubbard T, Wooster R, Rahman N, Stratton MR. 2004. A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer* 4:177–183.
- Gachet S, El-Chaar T, Avran D, Genesca E, Catez F, Quentin S, Delord M, Thérizols G, Briot D, Meunier G, Hernandez L, Pla M, Smits WK, Buijs-Gladdines JG, Van Loocke W, Menschaert G, André-Schmutz I, Taghon T, Van Vlierberghe P, Meijerink JP, Baruchel A, Dombret H, Clappier E, Diaz J-J, Gazin C, de Thé H, Sigaux F, Soulier J. 2018. Deletion 6q Drives T-cell Leukemia Progression by Ribosome Modulation. *Cancer Discov* 8:1614–1631.
- Gebhart E, Thoma K, Verdorfer I, Drexler HG, Efferth T. 2002. Genomic imbalances in T-cell acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Int J Oncol* 21:887–894.
- Gindina T, Beel K. 2018. t(10;14)(q24;q11) TLX1/TRD::t(7;10)(q34;q24) TRB/HOX11. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* 22:388–397.
- Girardi T, Vicente C, Cools J, De Keersmaecker K. 2017. The genetics and molecular biology of T-ALL. *Blood* 129:1113–1123.
- Graux C, Cools J, Michaux L, Vandenberghe P, Hagemeijer A. 2006. Cytogenetics and molecular genetics of T-cell acute lymphoblastic leukemia: from thymocyte to lymphoblast. *Leukemia* 20:1496–1510.
- Graux C, Stevens-Kroef M, Lafage M, Dastugue N, Harrison CJ, Mugneret F, Bahloula K, Struski S, Grégoire MJ, Nadal N, Lippert E, Taviaux S, Simons A, Kuiper RP,

- Moorman A V, Barber K, Bosly A, Michaux L, Vandenberghe P, Lahortiga I, De Keersmaecker K, Wlodarska I, Cools J, Hagemeijer A, Poirel HA, Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique, Belgian Cytogenetic Group for Hematology and Oncology. 2009. Heterogeneous patterns of amplification of the NUP214-ABL1 fusion gene in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 23:125–133.
- Grønbaek K, Hother C, Jones PA. 2007. Epigenetic changes in cancer. *APMIS* 115:1039–1059.
- Hagemeijer A, Graux C. 2010. ABL1 rearrangements in T-Cell acute lymphoblastic leukemia. *Genes, Chromosom Cancer* 49:299–308.
- Hecht F, Morgan R, Hecht BK, Smith SD. 1984. Common region on chromosome 14 in T-cell leukemia and lymphoma. *Science* 226:1445–1447.
- Hecht JL, Aster JC. 2000. Molecular biology of Burkitt's lymphoma. *J Clin Oncol* 18:3707–3721.
- Herman JG, Baylin SB. 2003. Gene Silencing in Cancer in Association with Promoter Hypermethylation. *N Engl J Med* 349:2042–2054.
- Hunger SP, Lu X, Devidas M, Camitta BM, Gaynon PS, Winick NJ, Reaman GH, Carroll WL. 2012. Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: A report from the children's oncology group. *J Clin Oncol* 30:1663–1669.
- Huret J. 2001. t(1;7)(p32;q34). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* 2:20–21.
- Hütter G, Kaiser M, Neumann M, Mossner M, Nowak D, Baldus CD, Gökbuget N, Hoelzer D, Thiel E, Hofmann W-K. 2011. Epigenetic regulation of PAX5 expression in acute T-cell lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 35:614–619.
- Ikeda M-A, Jakoi L, Nevins JR, Joklik WK. 1996. A unique role for the Rb protein in controlling E2F accumulation during cell growth and differentiation. *Biochemistry* 93:3215–3220.
- Jeha S, Pui CH. 2009. Risk-adapted Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 23:973–990.
- Jones PA, Baylin SB. 2002. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3:415–428.
- Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP. 1998. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 19:187–191.

- Kagan J, Finger LR, Letofsky J, Finan J, Nowell PC, Croce CM. 1989. Clustering of breakpoints on chromosome 10 in acute T-cell leukemias with the t(10;14) chromosome translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:4161–4165.
- Karrman K, Castor A, Behrendtz M, Forestier E, Olsson L, Ehinger M, Biloglav A, Fioretos T, Paulsson K, Johansson B. 2015. Deep sequencing and SNP array analyses of pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia reveal NOTCH1 mutations in minor subclones and a high incidence of uniparental isodisomies affecting CDKN2A. *J Hematol Oncol* 8:42.
- Karrman K, Forestier E, Heyman M, Andersen MK, Autio K, Blennow E, Borgström G, Ehrencrona H, Golovleva I, Heim S, Heinonen K, Hovland R, Johannsson JH, Kerndrup G, Nordgren A, Palmqvist L, Johansson B. 2009. Clinical and cytogenetic features of a population-based consecutive series of 285 pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemias: Rare T-cell receptor gene rearrangements are associated with poor outcome. *Genes, Chromosom Cancer* 48:795–805.
- Karrman K, Johansson B. 2017. Pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Genes, Chromosom Cancer* 56:89–116.
- Kawamura M, Ohnishi H, Guo SX, Sheng XM, Minegishi M, Hanada R, Horibe K, Hongo T, Kaneko Y, Bessho F, Yanagisawa M, Sekiya T, Hayashi Y. 1999. Alterations of the p53, p21, p16, p15 and RAS genes in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 23:115–126.
- Kaye FJ, Harbour JW. 2004. For Whom the Bell Tolls: Susceptibility to Common Adult Cancers in Retinoblastoma Survivors. *JNCI J Natl Cancer Inst* 96:342–343.
- De Keersmaecker K, Real PJ, Gatta G Della, Palomero T, Sulis ML, Tosello V, Van Vlierberghe P, Barnes K, Castillo M, Sole X, Hadler M, Lenz J, Aplan PD, Kelliher M, Kee BL, Pandolfi PP, Kappes D, Gounari F, Petrie H, Van der Meulen J, Speleman F, Paietta E, Racevskis J, Wiernik PH, Rowe JM, Soulier J, Avran D, Cavé H, Dastugue N, Raimondi S, Meijerink JPP, Cordon-Cardo C, Califano A, Ferrando AA. 2010. The TLX1 oncogene drives aneuploidy in T cell transformation. *Nat Med* 16:1321–1327.
- Kennedy MA, Gonzalez-Sarmiento R, Kees UR, Lampert F, Dear N, Boehm T, Rabbitts TH. 1991. HOX11, a homeobox-containing T-cell oncogene on human chromosome 10q24. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:8900–8904.
- Kitagawa Y, Inoue K, Sasaki S, Hayashi Y, Matsuo Y, Lieber MR, Mizoguchi H, Yokota J, Kohno T. 2002. Prevalent involvement of illegitimate V(D)J recombination in

- chromosome 9p21 deletions in lymphoid leukemia. *J Biol Chem* 277:46289–46297.
- Kleppe M, Lahortiga I, El Chaar T, De Keersmaecker K, Mentens N, Graux C, Van Roosbroeck K, Ferrando AA, Langerak AW, Meijerink JPP, Sigaux F, Haferlach T, Wlodarska I, Vandenberghe P, Soulier J, Cools J. 2010. Deletion of the protein tyrosine phosphatase gene PTPN2 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 42:530–535.
- Knudson AG. 1971. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci* 68:820–823.
- Lemež P, Attarbaschi A, Béné MC, Bertrand Y, Castoldi G, Forestier E, Garand R, Haas OA, Kagialis-Girard S, Ludwig W-D, Matutes E, Mejstříková E, Pages M-P, Pickl W, Porwit A, Orfao A, Schabath R, Starý J, Strobl H, Talmant P, Van't Veer MB, Zemanová Z, European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). 2010. Childhood near-tetraploid acute lymphoblastic leukemia: an EGIL study on 36 cases. *Eur J Haematol* 85:300–308.
- Levine AJ. 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88:323–331.
- Li GM. 2008. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res* 18:85–98.
- Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliaresis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. 1997. PTEN, a Putative Protein Tyrosine Phosphatase Gene Mutated in Human Brain, Breast, and Prostate Cancer. *Science* (80-) 275:1943–1947.
- Liu Y, Easton J, Shao Y, Maciaszek J, Wang Z, Wilkinson MR, McCastlain K, Edmonson M, Pounds SB, Shi L, Zhou X, Ma X, Sioson E, Li Y, Rusch M, Gupta P, Pei D, Cheng C, Smith MA, Auvin JG, Gerhard DS, Relling M V, Winick NJ, Carroll AJ, Heerema NA, Raetz E, Devidas M, Willman CL, Harvey RC, Carroll WL, Dunsmore KP, Winter SS, Wood BL, Sorrentino BP, Downing JR, Loh ML, Hunger SP, Zhang J, Mullighan CG. 2017. The genomic landscape of pediatric and young adult T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 49:1211–1218.
- López-Nieva P, Vaquero C, Fernández-Navarro P, González-Sánchez L, Villa-Morales M, Santos J, Esteller M, Fernández-Piqueras J. 2012. EPHA7, a new target gene for 6q deletion in T-cell lymphoblastic lymphomas. *Carcinogenesis* 33:452–458.
- Love RR. 1985. Small bowel cancers, B-cell lymphatic leukemia, and six primary cancers with metastases and prolonged survival in the cancer family syndrome of Lynch. *Cancer* 55:499–502.
- Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON. 1990. Tyrosine kinase activity and

- transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science* (80-) 247:1079–1082.
- Lustosa de Sousa DW, de Almeida Ferreira FV, Cavalcante Félix FH, de Oliveira Lopes MV. 2015. Acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: Prognostic factors and analysis of survival. *Rev Bras Hematol Hemoter* 37:223–229.
- Mackinnon RN, Chudoba I. 2011. The use of M-FISH and M-BAND to define chromosome abnormalities. *Methods Mol Biol* 730:203–218.
- Mansur MB, van Delft FW, Colman SM, Furness CL, Gibson J, Emerenciano M, Kempinski H, Clappier E, Cave H, Soulier J, Pombo-de-Oliveira MS, Greaves M, Ford AM. 2015. Distinctive genotypes in infants with T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 171:574–584.
- Mauvieux L, Helias C, Perrusson N, Lioure B, Sorel N, Brizard F, Lessard M. 2004. ETV6 (TEL) gene amplification in a myelodysplastic syndrome with excess of blasts. *Leukemia* 18:1436–1438.
- McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M. ISCN: an international system for human cytogenomic nomenclature (2016). New York: Karger, 2016. ISBN 978-3-318-05857-4.
- Michalová K. 1995. Fluorescenční in situ hybridizace (FISH) v klinické cytogenetice. *Čas Lék Čes* 134:73–76.
- Michalová K. 1999. Úvod do lidské cytogenetiky. Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví.
- Michalová K, Zemanová Z, Březinová J. 2001. Mnohobarevná fluorescenční in situ hybridizace (mFISH). *Čas Lék čes*:99–103.
- Michalová K, Zemanová Z, Březinová J, Michalová V. 1996. Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) in Cytogenetics of Leukemia. In: *Fluorescence Microscopy and Fluorescent Probes*. Boston, MA: Springer US. p 185–189.
- Miller JFAP. 2011. The golden anniversary of the thymus. *Nat Rev Immunol* 11:489–495.
- Mirji G, Bhat J, Kode J, Banavali S, Sengar M, Khadke P, Sait O, Chiplunkar S. 2016. Risk stratification of T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia patients based on gene expression, mutations and copy number variation. *Leuk Res* 45:33–39.
- Mitelman F, Johansson B, Mertens F. 2007. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer* 7:233–245.
- Modrich P. 1994. Mismatch repair, genetic stability, and cancer. *Science* 266:1959–1960.
- Morris LGT, Chan TA. 2015. Therapeutic targeting of tumor suppressor genes. *Cancer* 121:1357–1368.

- Motlló C, Ribera JM, Morgades M, Granada I, Montesinos P, González-Campos J, Fernández-Abellán P, Tormo M, Bethencourt C, Brunet S, Hernández-Rivas JM, Moreno MJ, Sarrá J, Del Potro E, Barba P, Bernal T, Grande C, Grau J, Cervera J, Feliu E. 2014. Prognostic significance of complex karyotype and monosomal karyotype in adult patients with acute lymphoblastic leukemia treated with risk-adapted protocols. *Cancer* 120:3958–3964.
- Mrózek K, Eisfeld AK, Kohlschmidt J, Carroll AJ, Walker CJ, Nicolet D, Blachly JS, Bill M, Papaioannou D, Wang ES, Uy GL, Kolitz JE, Powell BL, Blum W, Stone RM, Byrd JC, Bloomfield CD. 2019. Complex karyotype in de novo acute myeloid leukemia: typical and atypical subtypes differ molecularly and clinically. *Leukemia* 33:1620–1634.
- Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, Miller CB, Coustan-Smith E, Dalton JD, Girtman K, Mathew S, Ma J, Pounds SB, Su X, Pui CH, Relling MV, Evans WE, Shurtleff SA, Downing JR. 2007. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 446:758–764.
- Mullighan CG, Phillips LA, Su X, Ma J, Miller CB, Shurtleff SA, Downing JR. 2008. Genomic Analysis of the Clonal Origins of Relapsed Acute Lymphoblastic Leukemia. *Science* (80-) 322:1377–1380.
- Nemazee D. 2006. Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. *Nat Rev Immunol* 6:728–740.
- Nguyen K, Devidas M, Cheng S-C, La M, Raetz EA, Carroll WL, Winick NJ, Hunger SP, Gaynon PS, Loh ML. 2008. Factors influencing survival after relapse from acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Leukemia* 22:2142–2150.
- Le Noir S, Ben Abdelali R, Lelorch M, Bergeron J, Sungalee S, Payet-Bornet D, Villarese P, Petit A, Callens C, Lhermitte L, Baranger L, Radford-Weiss I, Gregoire M-J, Dombret H, Ifrah N, Spicuglia S, Romana S, Soulier J, Nadel B, Macintyre E, Asnafi V. 2012. Extensive molecular mapping of TCR / - and TCR -involved chromosomal translocations reveals distinct mechanisms of oncogene activation in T-ALL. *Blood* 120:3298–3309.
- Nowell PC. 1997. Genetic alterations in leukemias and lymphomas: Impressive progress and continuing complexity. *Cancer Genet Cytogenet* 94:13–19.
- Ntziachristos P, Tsirigos A, Vlierberghe P Van, Nedjic J, Trimarchi T, Flaherty MS, Ferres-Marco D, da Ros V, Tang Z, Siegle J, Asp P, Hadler M, Rigo I, Keersmaecker

- K De, Patel J, Huynh T, Utro F, Poglio S, Samon JB, Paietta E, Racevskis J, Rowe JM, Rabadan R, Levine RL, Brown S, Pflumio F, Dominguez M, Ferrando A, Aifantis I. 2012. Genetic inactivation of the polycomb repressive complex 2 in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med* 18:298–302.
- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99:247–257.
- Olshanskaya Y, Kazakova A, Tsaur G, Zerkalenskova E, Soldatkina O, Aprelova E, Plekhanova O, Gindina T, Mercur'ev D, Barhkatov I, Baidun L, Bydanov O, Lagoiko S, Tallen G, Rumiantseva J, Rumiantsev A, Karachunskii A, Henze G. 2019. Clinical significance of cytogenetic changes in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: results of the multicenter group Moscow–Berlin (MB). *Leuk Lymphoma* 60:426–432.
- Orlow I, Lacombe L, Hannon GJ, Serrano M, Pellicer I, Dalbagni G, Reuter VE, Zhang ZF, Beach D, Cordon-Cardo C. 1995. Deletion of the p16 and p15 Genes in Human Bladder Tumors. *JNCI J Natl Cancer Inst* 87:1524–1529.
- Papaemmanuil E, Hosking FJ, Vijayakrishnan J, Price A, Olver B, Sheridan E, Kinsey SE, Lightfoot T, Roman E, Irving JAE, Allan JM, Tomlinson IP, Taylor M, Greaves M, Houlston RS. 2009. Loci on 7p12.2, 10q21.2 and 14q11.2 are associated with risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 41:1006–1010.
- Paulsson K, Johansson B. 2009. High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes, Chromosom Cancer* 48:637–660.
- Perez-Andreu V, Roberts KG, Harvey RC, Yang W, Cheng C, Pei D, Xu H, Gastier-Foster J, E S, Lim JYS, Chen IM, Fan Y, Devidas M, Borowitz MJ, Smith C, Neale G, Burchard EG, Torgerson DG, Klussmann FA, Villagran CRN, Winick NJ, Camitta BM, Raetz E, Wood B, Yue F, Carroll WL, Larsen E, Bowman WP, Loh ML, Dean M, Bhojwani D, Pui CH, Evans WE, Relling M V, Hunger SP, Willman CL, Mullighan CG, Yang JJ. 2013. Inherited GATA3 variants are associated with Ph-like childhood acute lymphoblastic leukemia and risk of relapse. *Nat Genet* 45:1494–1498.
- Pui CH, Evans WE. 2013. A 50-year journey to cure childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol* 50:185–196.
- Rakowski LA, Lehotzky EA, Chiang MY. 2011. Transient responses to NOTCH and TLX1/HOX11 inhibition in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *PLoS One* 6:e16761.

- Raschke S, Balz V, Efferth T, Schulz WA, Florl AR. 2005. Homozygous deletions of CDKN2A caused by alternative mechanisms in various human cancer cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 42:58–67.
- Remke M, Pfister S, Kox C, Toedt G, Becker N, Benner A, Werft W, Breit S, Liu S, Engel F, Wittmann A, Zimmermann M, Stanulla M, Schrappe M, Ludwig WD, Bartram CR, Radlwimmer B, Muckenthaler MU, Lichter P, Kulozik AE. 2009. High-resolution genomic profiling of childhood T-ALL reveals frequent copy-number alterations affecting the TGF-beta and PI3K-AKT pathways and deletions at 6q15-16.1 as a genomic marker for unfavorable early treatment response. *Blood* 114:1053–1062.
- Ritterbach J, Hiddemann W, Beck JD, Schrappe M, Janka-Schaub G, Ludwig WD, Harbott J, Lampert F. 1998. Detection of hyperdiploid karyotypes (>50 chromosomes) in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Leukemia* 12:427–433.
- Robledo M, Martinez B, Arranz E, Trujillo MJ, Gonzalez Ageitos A, Rivas C, Benitez J. 1995. Genetic instability of microsatellites in hematological neoplasms. *Leukemia* 9:960–964.
- Rohil Y, Shetty D, Jain H. 2019. Isochromosome i(9)(q10): A Rare Chromosomal Aberration in B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clin Oncol Case Rep* 2:9–11.
- Roti G, Stegmaier K. 2014. New Approaches to Target T-ALL. *Front Oncol* 4:170.
- Schmiegelow K, Lausten Thomsen U, Baruchel A, Pacheco CE, Pieters R, Pombo-de-Oliveira MS, Andersen EW, Rostgaard K, Hjalgrim H, Pui CH. 2012. High concordance of subtypes of childhood acute lymphoblastic leukemia within families: lessons from sibships with multiple cases of leukemia. *Leukemia* 26:675–681.
- Schneider NR, Carroll AJ, Shuster JJ, Pullen DJ, Link MP, Borowitz MJ, Camitta BM, Katz JA, Amylon MD. 2000. New recurring cytogenetic abnormalities and association of blast cell karyotypes with prognosis in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: a pediatric oncology group report of 343 cases. *Blood* 96:2543–2549.
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G. 2002. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 30:e57.
- Seif AE. 2011. Pediatric leukemia predisposition syndromes: clues to understanding leukemogenesis. *Cancer Genet* 204:227–244.
- Shaffer LG, Beaudet AL, Brothman AR, Hirsch B, Levy B, Martin CL, Mascarello JT,

- Rao KW, Working Group of the Laboratory Quality Assurance Committee of the American College of Medical Genetics. 2007. Microarray analysis for constitutional cytogenetic abnormalities. *Genet Med* 9:654–662.
- Sherborne AL, Hosking FJ, Prasad RB, Kumar R, Koehler R, Vijayakrishnan J, Papaemmanuil E, Bartram CR, Stanulla M, Schrappe M, Gast A, Dobbins SE, Ma Y, Sheridan E, Taylor M, Kinsey SE, Lightfoot T, Roman E, Irving JAE, Allan JM, Moorman A V, Harrison CJ, Tomlinson IP, Richards S, Zimmermann M, Szalai C, Semsei ÁF, Erdelyi DJ, Krajcinovic M, Sinnott D, Healy J, Neira AG, Kawamata N, Ogawa S, Koefler HP, Hemminki K, Greaves M, Houlston RS. 2010. Variation in CDKN2A at 9p21.3 influences childhood acute lymphoblastic leukemia risk. *Nat Genet* 42:492–494.
- Sinclair PB, Sorour A, Martineau M, Harrison CJ, Mitchell WA, O'Neill E, Foroni L. 2004. A fluorescence in situ hybridization map of 6q deletions in acute lymphocytic leukemia: identification and analysis of a candidate tumor suppressor gene. *Cancer Res* 64:4089–4098.
- Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Döhner H, Cremer T, Lichter P. 1997. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 20:399–407.
- Stowers SJ, Maronpot RR, Reynolds SH, Anderson MW. 1987. The role of oncogenes in chemical carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 75:81–86.
- Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. 2009. The cancer genome. *Nature* 458:719–724.
- Sugimoto K-J, Shimada A, Wakabayashi M, Sekiguchi Y, Izumi H, Ota Y, Komatsu N, Noguchi M. 2014. T-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(7;14)(p15;q32) [TCRγ-TCL1A translocation]: a case report and a review of the literature. *Int J Clin Exp Pathol* 7:2615–2623.
- Sulis ML, Williams O, Palomero T, Tosello V, Pallikuppam S, Real PJ, Barnes K, Zuurbier L, Meijerink JP, Ferrando AA. 2008. NOTCH1 extracellular juxtamembrane expansion mutations in T-ALL. *Blood* 112:733–740.
- Szczepański T, van der Velden VHJ, Waanders E, Kuiper RP, Van Vlierberghe P, Gruhn B, Eckert C, Panzer-Grümayer R, Basso G, Cavé H, Stadt U, Campana D, Schrauder A, Sutton R, van Wering E, Meijerink JPP, van Dongen JJM. 2011. Late Recurrence of Childhood T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Frequently Represents a Second Leukemia Rather Than a Relapse: First Evidence for Genetic Predisposition. *J Clin Oncol* 29:1643–1649.

- Travert M, Huang Y, De Leval L, Martin-Garcia N, Delfau-Larue MH, Berger F, Bosq J, Brière J, Soulier J, MacIntyre E, Marafioti T, De Reyniès A, Gaulard P. 2012. Molecular features of hepatosplenic T-cell lymphoma unravels potential novel therapeutic targets. *Blood* 119:5795–5806.
- Treviño LR, Yang W, French D, Hunger SP, Carroll WL, Devidas M, Willman C, Neale G, Downing J, Raimondi SC, Pui CH, Evans WE, Relling M V. 2009. Germline genomic variants associated with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 41:1001–1005.
- Tzoneva G, Perez-Garcia A, Carpenter Z, Khiabani H, Tosello V, Allegretta M, Paietta E, Racevskis J, Rowe JM, Tallman MS, Paganin M, Basso G, Hof J, Kirschner-Schwabe R, Palomero T, Rabadan R, Ferrando A. 2013. Activating mutations in the NT5C2 nucleotidase gene drive chemotherapy resistance in relapsed ALL. *Nat Med* 19:368–371.
- Urayama KY, Buffler PA, Gallagher ER, Ayoob JM, Ma X. 2010. A meta-analysis of the association between day-care attendance and childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Int J Epidemiol* 39:718–732.
- Van Vlierberghe P, Ambesi-Impiombato A, De Keersmaecker K, Hadler M, Paietta E, Tallman MS, Rowe JM, Forne C, Rue M, Ferrando AA. 2013. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in adult T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 122:74–82.
- Van Vlierberghe P, Ambesi-Impiombato A, Perez-Garcia A, Haydu JE, Rigo I, Hadler M, Tosello V, Della Gatta G, Paietta E, Racevskis J, Wiernik PH, Luger SM, Rowe JM, Rue M, Ferrando AA. 2011. ETV6 mutations in early immature human T cell leukemias. *J Exp Med* 208:2571–2579.
- Van Vlierberghe P, Ferrando AA. 2012. The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest* 122:3398–3406.
- Van Vlierberghe P, Homminga I, Zuurbier L, Gladdines-Buijs J, van Wering ER, Horstmann M, Beverloo HB, Pieters R, Meijerink JPP. 2008a. Cooperative genetic defects in TLX3 rearranged pediatric T-ALL. *Leukemia* 22:762–770.
- Van Vlierberghe P, Pieters R, Beverloo HB, Meijerink JPP. 2008b. Molecular-genetic insights in paediatric T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 143:153–168.
- Waheed S, Hassan J, Naz M, Maqsood S, Abid M, Shan S, Nadeem M, Shamsi TS. 2018. Complex Karyotype in Hematological Diseases: A 6-Year Single Centre Study from

Pakistan. *J Oncol* 2018;2019239.

Wakeford R. 2008. Childhood leukaemia following medical diagnostic exposure to ionizing radiation in utero or after birth. *Radiat Prot Dosimetry* 132:166–174.

Ward E, DeSantis C, Robbins A, Kohler B, Jemal A. 2014. Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 64:83–103.

Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JP, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, Blacklow SC, Look AT, Aster JC. 2004. Activating Mutations of NOTCH1 in Human T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Science* (80-) 306:269–271.

Winther JF, Sankila R, Boice JD, Tulinius H, Bautz A, Barlow L, Glatte E, Langmark F, Möller TR, Mulvihill JJ, Olafsdottir GH, Ritvanen A, Olsen JH. 2001. Cancer in siblings of children with cancer in the Nordic countries: a population-based cohort study. *Lancet* 358:711–717.

Yui MA, Rothenberg E V. 2014. Developmental gene networks: a triathlon on the course to T cell identity. *Nat Rev Immunol* 14:529–545.

Zachariadis V, Gauffin F, Kuchinskaya E, Heyman M, Schoumans J, Blennow E, Gustafsson B, Barbany G, Golovleva I, Ehrencrona H, Cavelier L, Palmqvist L, Lönnerholm G, Nordenskjöld M, Johansson B, Forestier E, Nordgren A, Nordic Society of Pediatric Hematology O (NOPHO), Swedish Cytogenetic Leukemia Study Group (SCLSG). 2011. The frequency and prognostic impact of dic(9;20)(p13.2;q11.2) in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results from the NOPHO ALL-2000 trial. *Leukemia* 25:622–628.

Zemanová Z, Michalová K, Březinová J. 2019. Význam cytogenetické a molekulárně cytogenetické analýzy v diagnostice hematologických malignit v době nových sekvenačních technik. *Čas Lék čes* 158:22–27.

Zhang J, Ding L, Holmfeldt L, Wu G, Heatley SL, Payne-Turner D, Easton J, Chen X, Wang J, Rusch M, Lu C, Chen S-C, Wei L, Collins-Underwood JR, Ma J, Roberts KG, Pounds SB, Ulyanov A, Becksfort J, Gupta P, Huether R, Kriwacki RW, Parker M, McGoldrick DJ, Zhao D, Alford D, Espy S, Bobba KC, Song G, Pei D, Cheng C, Roberts S, Barbato MI, Campana D, Coustan-Smith E, Shurtleff SA, Raimondi SC, Kleppe M, Cools J, Shimano KA, Hermiston ML, Doulatov S, Eppert K, Laurenti E, Notta F, Dick JE, Basso G, Hunger SP, Loh ML, Devidas M, Wood B, Winter S, Dunsmore KP, Fulton RS, Fulton LL, Hong X, Harris CC, Dooling DJ, Ochoa K, Johnson KJ, Obenauer JC, Evans WE, Pui C-H, Naeve CW, Ley TJ, Mardis ER, Wilson RK, Downing JR, Mullighan CG. 2012. The genetic basis of early T-cell

precursor acute lymphoblastic leukaemia. Nature 481:157–163.

INTERNETOVÉ ZDROJE:

National Library of Medicine (US). Genetics Home Reference [Internet]. Bethesda (MD): The Library; July 16, 2019. ETV6 gene; [reviewed 2013 Feb; cited 2019 Jul 31].

Available from: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/ETV6>

National Library of Medicine (US). Genetics Home Reference [Internet]. Bethesda (MD): The Library; July 16, 2019. NOTCH1 gene; [reviewed 2015 Nov; cited 2019 Jul 31].

Available from: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/NOTCH1>

MRC-Holland [Internet]. MRC-Holland; 2019. How Does MLPA® Work?; [cited 2019 Jul 31].

Available from: https://www.mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=_hS-AvFINWhkPMYt9ZIZdCx7-VkDGgJqQ1uzZmJTgWTQ.

10 PŘÍLOHY: TABULKY

Tabulka 11. Klinické údaje.

Č.p.	Pohlaví	Věk při diagnóze	Datum diagnózy	Současný stav	Doba sledování
1	F	4	09/1995	CR1	22,4
2	M	5	02/1996	exitus	1,8
3	F	3	08/1996	CR1	21,5
4	M	5	08/1998	CR1	19,5
5	M	6	03/2000	exitus	2,0
6	M	10	04/2000	CR1	17,8
7	M	8	01/2001	CR1	17,1
8	F	1	04/2001	exitus	0,1
9	M	2	10/2001	exitus	1,8
10	M	7	11/2001	CR1	16,2
11	M	15	04/2002	CR1	15,9
12	M	5	07/2002	CR1	15,6
13	M	3	05/2003	CR1	14,8
14	M	15	09/2003	CR1	14,4
15	M	11	11/2003	CR1	14,2
16	F	12	03/2004	SM	10,4
17	M	17	12/2004	CR1	13,2
18	M	17	12/2004	exitus	0,5
19	M	5	12/2004	exitus	1,1
20	F	5	03/2005	exitus	2,3
21	F	9	06/2005	CR1	12,7
22	F	4	12/2005	CR1	12,2
23	M	8	02/2006	exitus	4,5
24	M	17	02/2006	CR1	12,0
25	M	18	09/2006	CR1	11,4
26	F	4	12/2006	CR1	11,2
27	F	18	02/2007	CR1	11,0
28	M	16	09/2007	CR1	10,4
29	M	15	02/2008	exitus	0,6
30	M	6	12/2008	exitus	0,0
31	M	11	04/2009	CR1	8,8
32	F	6	05/2009	CR1	8,7
33	M	13	10/2008	CR1	9,3
34	M	13	08/2009	CR1	8,5

Č.p.	Pohlaví	Věk při diagnóze	Datum diagnózy	Současný stav	Doba sledování
35	M	9	08/2009	CR1	8,5
36	F	17	09/2008	exitus	1,0
37	M	1	11/2009	exitus	0,7
38	M	18	05/2010	CR1	7,8
39	M	4	2.8.2010	CR2	7,5
40	M	6	08/2011	exitus	2,3
41	M	8	05/2011	CR1	6,8
42	M	6	01/2011	CR1	7,1
43	F	15	10/2012	CR1	5,3
44	M	7	07/2013	exitus	4,6
45	F	2	06/2012	exitus	1,2
46	M	16	12/2013	CR1	4,1
47	M	15	07/2012	exitus	3,0
48	M	9	08/2012	CR1	5,5
49	F	8	01/2013	CR1	5,1
50	M	13	04/2013	CR1	4,8
51	M	6	06/2013	CR1	4,6
52	F	6	09/2013	exitus	1,9
53	F	9	05/2014	CR1	3,8
54	M	6	09/2014	CR1	3,4
55	M	16	01/2015	CR1	3,1
56	F	5	03/2015	CR1	3,0
57	M	15	03/2015	CR1	2,9
58	M	13	02/2016	CR1	2,0
59	M	6	03/2016	exitus	2,7
60	M	4	04/2016	relaps	1,9
61	M	10	07/2016	CR1	1,6
62	M	10	09/2016	CR1	1,4
63	M	16	10/2016	CR1	1,4
64	F	12	02/2016	relaps	2,0
65	M	8	05/2017	CR1	0,7
66	M	4	08/2017	CR1	0,5
67	F	2	08/2017	exitus	0,5

Tabulka 12. Výsledky vyšetření.

Č.p.	Karyotyp	TRA/TRD	TRB	TRG	CDKN2A	BCR/ ABL1	TLX3	TLX1	MLPA
1	46,XX,t(10;11)(p13;q21)[30]/ 46,XX[3]	nn	nn	nn	nn	nn	nn	-	amplifikace ETV6 a BGT1
2	0 mitóza	nn	nn	nn	bialelická delece 96 %	+BCR 10 %	přestavba 80 %	-	bialelická delece CDKN2A a CDKN2B
3	46,XX,t(8;14)(q24;q11)[19]/ 46,XX[10]	přestavba 28 %	nn	nn	bialelická delece 87 %	nn	-	nn	bialelická delece CDKN2A a CDKN2B, delece PAX5
4	65~82,XY,+X,+9,+9,- 16,+18,+18,+20,+20,+22,+22, +10~17mar,inc[cp13]/46,XY[9]	přestavba 54 %	přestavba 77 %	nn	bialelická delece 88 %	+ABL1 +BCR 21 %	-	-	-
5	46,XY[15]	nn	nn	nn	delece 89 %	nn	nn	-	nn
6	0 mitóza	nn	nn	nn	nn	nn	nn	-	-
7	46,XY[13]	nn	nn	nn	nn	nn	nn	-	nn
8	46,X,t(X;20)(q24;p11.2),der(5)dup(5)(p?),der(6)ins(6;14)(q21;q?),del(11)(q13q22),der(21)t(6;21)(?;q22.2)[22]	nn	nn	nn	delece 94 %	nn	nn	-	-
9	44~45,XY,del(4)(q28),der(5)t(5;10)(q14;q24),+der(7)t(7;17)(q32;?)t(4;17)(q28;?),- 13,der(21)t(13;21)(q22;q21),ins(22;11)(q12;q?)cp19/46,XY[3]	nn	+TRB 10 %	+TRG 10 %	nn	nn	nn	-	delece CDKN2A-4
10	46,XY[10]	přestavba 33 %	nn	nn	bialelická delece 83 %	nn	nn	-	-
11	46,XY,t(1;7)(p32;q34),del(9)(p?),t(11;14)(p13;q11)[15]/46,XY[8]	přestavba 38 %	přestavba 38 %	nn	bialelická delece 55 %	nn	-	-	delece CDKN2A a CDKN2B
12	46,XY[15]	nn	nn	nn	nn	nn	-	-	delece CDKN2A-4, hraniční delece CDKN2A- 2, CDKN2B
13	46,XY,t(11;14)(p13;q11)[10]/ 46,XY[4]	přestavba 48 %	nn	nn	nn	nn	-	-	delece CDKN2A a CDKN2B

Č.p.	Karyotyp	TRA/TRD	TRB	TRG	CDKN2A	BCR/ ABL1	TLX3	TLX1	MLPA
14	46,XY[10]	nn	nn	nn	nn	nn	-	-	-
15	0 mitóz	nn	přestavba 30 %	nn	bialelická delece 97 %	+ABL1 29 %	-	přestavba 95 %	-
16	0 mitóz	nn	nn	nn	delece 65 %	+ABL1 52 %	nn	-	-
17	46,XY,inv(11)(p11.2q13.3)[8]/ 46,XY[4]	přestavba 43 %	nn	-	delece 7 %	nn	-	-	-
18	46,XY[20]	nn	nn	nn	nn	nn	nn	-	-
19	46,XY,?del(3)(p?),del(6)(q?)[4]/ 46,XY[13]	nn	nn	nn	nn	nn	přestavba 89 %	-	-
20	46,XX[20]	nn	nn	nn	nn	nn	přestavba 93 %	-	-
21	0 mitóz	přestavba 51 %	nn	nn	monosomie 76 %	nn	nn	-	-
22	46,XX[14]	nn	nn	nn	nn	nn	-	-	-
23	96,XXYY[7]/46,XY[20]	nn	nn	nn	nn	+ABL1 19 %	nn	-	-
24	46,XY[10]	nn	nn	nn	nn	nn	nn	-	bialelická delece CDKN2A-A
25	46,XY,t(1;14)(p32;q11.2), ?del(6)(p?) [3]/46,XY[13]	přestavba 21 %	nn	nn	delece 25 %	nn	nn	-	-
26	46,XX,t(5;9)(q12;q34.3),t(14;21) (q21;q22.3)[14]/46,XX[4]	nn	nn	nn	nn	nn	nn	-	-
27	46,XX[14]	nn	nn	nn	nn	nn	nn	-	bialelická delece CDKN2A
28	46,XY,der(9;15)(q13;p11),+9[9]/ 46,XY[5]	nn	nn	nn	bialelická delece 99 %	+ABL1 93 %	nn	-	-
29	47,XY,+mar[3]/46,XY[10]	nn	nn	nn	nn	nn	přestavba 73 %	-	bialelická delece CDKN2A a CDKN2B, amplifikace EBF1-1, ETV6-1, BTG1-1
30	46,XX[13]	nn	nn	nn	bialelická delece 68 %	nn	nn	-	bialelická delece CDKN2A a CDKN2B

Č.p.	Karyotyp	TRA/TRD	TRB	TRG	CDKN2A	BCR/ABL1	TLX3	TLX1	MLPA
31	47,XY,+8,i(9)(q10),t(10;14)(q24;q11)[19]/46,XY[5]	přestavba 88 %	nn	nn	bialelická delece 83 %	+ABL1 66 %	-	přestavba 92 %	bialelická delece CDKN2A a CDKN2B, delece JAK2, PAX5
32	46,XX[20]	přestavba 62 %	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn
33	46,XY,ins(6;14)(q25.3;q?)[11]	nn	nn	nn	nn	nn	přestavba 57 %	nn	nn
34	46,XY[10]	nn	nn	nn	nn	nn	nn	-	-
35	46,XY,i(9)(q10)[17]/46,XY[3]	nn	nn	nn	delece 84 %	+ABL1 79 %	nn	-	bialelická delece CDKN2A a CDKN2B, delece JAK2, PAX5
36	40~45,X-X,t(10;11)(p13;q21),del(12)(p12),del(13)(q22;q33),del(17)(p11.2)[cp22]	nn	nn	nn	delece 95 %	nn	nn	-	bialelická delece CDKN2A a CDKN2B, ETV6
37	46,XY,t(9;11)(p22;q23)[5]/46,XY[13]	nn	nn	nn	nn	nn	nn	-	nn
38	46,XY[10]	nn	nn	nn	nn	-ABL1 99 %	nn	-	delece ETV6, amplifikace BTG1-1
39	46,XY[16]	nn	nn	nn	bialelická delece 87 %	nn	nn	nn	bialelická delece CDKN2A a CDKN2B
40	48,XY,add(1)(p36.1),t(5;14)(q35;q32),i(7)(q10),+9,+13[15]/46,XY[5]	nn	nn	nn	bialelická delece 90 %	nn	přestavba 93 %	-	bialelická delece CDKN2A a CDKN2B
41	46,XY,t(11;18)(p14;p11.3)[9]/46,XY[1]	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	bialelická delece CDKN2A a CDKN2B
42	46,XY[20]	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn
43	46,XX,ins(1;7)(p32;q34q34)[10]/46,XX[1]	nn	duplikace 5' konce 95 %	nn	nn	nn	nn	-	bialelická delece CDKN2B
44	46,XY[20]	nn	nn	nn	bialelická delece 98 %	nn	přestavba 93 %	nn	bialelická delece CDKN2A a CDKN2B
45	46,XX,t(1;11;8;6)(p?36;p11.2;q?13;p25)[16]/46,XX[2]	nn	nn	nn	nn	nn	nn	-	bialelická delece CDKN2A

Č.p.	Karyotyp	TRA/TRD	TRB	TRG	CDKN2A	BCR/ ABL1	TLX3	TLX1	MLPA
46	46,XY,del(9)(p21p?),t(10;14)(q24;q11)[7]/47,XY,?del(9)(p21p?),t(10;14)(q?24;q11),+11[3]/46,XY[26]	přestavba 71 %	nn	nn	bialelická delece 66 %	nn	nn	přestavba 79 %	bialelická delece CDKN2A a CDKN2B, hraniční bialelická delece exonů RB1 19-26
47	47,XY,+19[5]/46,XY[11]	ztráta 76 %	nn	nn	nn	nn	nn	4 kopie 6 %	nn
48	46,XY,t(10;11)(p?12;q14.1),del(12)(p12)[10]/89~92,XXYY,t(10;11)(p?12;q14.1)x2,del(12)(p12)x2[cp4]	nn	nn	nn	bialelická delece 81 %	nn	-	-	bialelická delece CDKN2A a CDKN2B, delece ETV6
49	46,XY[7]	nn	přestavba 32 %	nn	bialelická delece 89 %	+ABL1 87 %	nn	nn	bialelická delece CDKN2A a CDKN2B, delece JAK2
50	nejdou mitózy	nn	nn	nn	nn	nn	přestavba 66 %	nn	nn
51	46,XY,del(22)(q?) [10]/46,XY[10]	nn	nn	nn	bialelická delece 96 %	-BCR 98 %	přestavba 89 %	nn	bialelická delece CDKN2A a CDKN2B
52	46,XX,der(1)t(1;19)(p36.3;?),der(4)t(1;4)(q?31;?),del(5)(q?),der(6)t(6;13)(q?25;q?),der(9)t(8;9)(?;p?22),der(11)t(10;11)(?;p15),del(12)(q?),der(16)t(10;16)(?;q?),der(19)t(16;19)(?;?) [cp4]/46,XX[12]	nn	nn	nn	delece 10 %	nn	přestavba 7 %	nn	bialelická delece CDKN2A, delece CDKN2B, JAK2-23, COL11A1, BTG1-2, hraniční BTG-AREA-down, BTG1-1
53	0 mitóza	nn	nn	nn	nn	nn	nn	-	delece RB1, BTG1
54	46,XY,del(6)(q21q22)[18]/46,XY[2]	nn	nn	nn	delece 94 %	nn	přestavba 91 %	-	delece CDKN2A a CDKN2B
55	46,XY,t(7;11)(q34;p13)[20]	nn	přestavba 86 %	nn	delece 13 %	nn	nn	-	bialelická delece CDKN2A
56	46,XX,t(5;14)(q35;q32)[2]/92,XXX X,del(5)(q13.3q31.??)x2,t(5;14) (q35;q32)x2[17]/46,XX[1]	nn	nn	nn	bialelická delece 23 %	nn	přestavba 93 %	-	bialelická delece CDKN2A a CDKN2B
57	46,XY,t(5;14)(q35;q32),der(6)t(1;6) (q41;q27),del(9)(p21p21)[5]	nn	nn	nn	delece 95 %	nn	přestavba 90 %	-	delece CDKN2A a CDKN2B

Č.p.	Karyotyp	TRA/TRD	TRB	TRG	CDKN2A	BCR/ ABL1	TLX3	TLX1	MLPA
58	0 mitóz	nn	nn	nn	parciální delece 43 %	nn	nn	nn	bialelická delece CDKN2A, delece CDKN2B
59	48,XY,+der(7)t(5;7)(?,q?),+der(7) t(7;?20)(q?,?)5]/46,XY[4]	nn	+TRB 94 %	+TRG 96 %	bialelická delece 96 %	nn	delece 5'konce 100 %	nn	bialelická delece CDKN2A a CDKN2B, amplifikace 7p s delecí 4-7 exonu IKZF1
60	46,XY,del(6)(q?12q14)[6]/ 46,XY[16]	nn	nn	nn	delece 7,5 %	nn	nn	nn	bialelická delece CDKN2A
61	45,XY,dic(6;13)(q11;p11.)[19]/ 46,XY[3]	nn	nn	nn	delece 93 %	nn	nn	nn	delece CDKN2A a CDKN2B
62	46,XY[12]	nn	nn	nn	delece 63 %	nn	přestavba 79 %	nn	delece CDKN2A a CDKN2B
63	46,XY[13]	nn	nn	nn	bialelická delece 96 %	nn	přestavba 94 %	nn	bialelická delece CDKN2A a CDKN2B
64	46,XX,del(5)(q14q35.3),del(9)(p21 p21)[3]/46,XX[3]	nn	nn	nn	bialelická delece 75 %	nn	parciální delece 99 %	nn	bialelická delece CDKN2A- 2, CDKN2B, delece 5q33.3, CDKN2A-4, Xp22PAR
65	47,XY,+8[21]/46,XY[1]	nn	+TRB 91 %	nn	bialelická delece 93 %	nn	delece 3'konce 91 %	nn	bialelická delece CDKN2A a CDKN2B, delece PAX5
66	46,XY,t(7;9)(q34;q32)[16]/46,idem, del(6)(q16.2q26)[6]	nn	přestavba 87 %	nn	nn	nn	nn	nn	delece CDKN2A, amplifikace RB1
67	46,XX,der(14)t(11;14)(p14;q24.2), del(9)(p13pter)[14]	nn	nn	nn	bialelická delece 96 %	nn	nn	nn	bialelická delece CDKN2A a CDKN2B, delece JAK2